

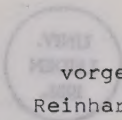
**CHEMISCH-PHYSIKALISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN SPINNENHÄMOCYANINEN UND IHREN
UNTEREINHEITEN**

Reinhard Schmid

1976

CHEMISCH-PHYSIKALISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN SPINNENHÄMOCYANINEN UND IHREN
UNTEREINHEITEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Ludwig - Maximilians - Universität
zu München


vorgelegt von
Reinhard Schmid
aus Fürstenfeldbruck

Juni 1976

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernt Linzen
 2. Berichterstatter: Dr. Ahlert Schmidt
- Tag der mündlichen Prüfung: 23.7.76



Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut
der Universität München unter Anleitung von Herrn
Prof. Dr. Bernt Linzen durchgeführt.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen,
der durch sein starkes Interesse, seine Hilfsbereit-
schaft und seine wertvollen Anregungen viel zum Gelingen
dieser Arbeit beigetragen hat.

Weiter danke ich Frau Dr. R. Loewe für die Aufnahme der
Sauerstoffbindungskurven und der elektronenmikroskopischen
Bilder.

Herzlich bedanken möchte ich mich ferner bei Frau
H. Geisert für die Anfertigung der technischen Zeichnungen,
sowie allen Kollegen für die angenehme Zusammenarbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODEN	3
1. Chemikalien	3
2. Tiere und Tierhaltung	3
3. Entnahme der Hämolymphe	4
4. Puffer	4
5. Quantitative Bestimmungen	4
5.1 pH-Wert der Hämolymphe	4
5.2 Protein	5
5.3 Gesamtmagnesium	5
5.4 Gesamtkalzium	5
5.5 Kupfer	5
6. Gefriertrocknung	5
7. Elektrophoresen	5
7.1 Analytische Discelektrophorese im Polyacrylamidgel	5
7.2 Analytische Discelektrophorese im Agarose-Acrylamidgel	6
7.3 Anfärbung und Auswertung der Gele	6
7.4 Korrelation zwischen Bandenmuster und Sedimentationskonstanten	6
8. Trägerfreie Isoelektrofokussierung nach Macko und Stegemann	7
9. Chromatographische Methoden	7
9.1 Chromatographie über Sepharose 4B-200	7
9.2 Chromatographie über Biogel A 5m	7
9.3 Chromatographie über Sephadex	8
10. Dichtegradientenzentrifugation	8
11. Verhalten in der analytischen Ultrazentrifuge	8
11.1 Sedimentationsanalysen	8
11.1.1 Moving boundary - Methode	9
11.1.2 Bandsedimentation nach Vinograd	9

11.1.3 Bestimmung der Sedimentationskonstanten	9
11.2 Molekulargewichtsbestimmungen	10
11.3 Zusatzmessungen	11
11.3.1 Dichtemessung	11
11.3.2 Viskositätsbestimmung	11
11.3.3 Bestimmung des partiellen spezifischen Volumen	11
11.4 Dissoziationsversuche	11
11.5 Dissoziations-Assoziationsgleichgewichte	12
11.6 Reassoziationsversuche	12
12. Messung der Sauerstoffbindungskurven	13
13. Elektronenmikroskopie	13
14. Endgruppenbestimmung	13
 C. ERGEBNISSE	 14
1. Vorversuche	14
1.1 Das Proteilmuster der Gesamthämolymphe	14
1.2 Bestimmung von Gesamtkalzium und -magnesium	15
2. Isolierung und Charakterisierung von reinen 37 S-, 24 S-, 16 S-, 6 S- und 5 S-Hämocyanin- komponenten	16
2.1 Zentrifugation im Dichtegradienten	16
2.2 Gelfiltration	18
2.3 Isoelektrofokussierung	20
2.4 Sedimentationsanalyse	22
2.4.1 Bestimmung von Sedimentationskonstanten	22
2.4.2 Bestimmung von Molekulargewichten	24
3. Elektrophoretisches Verhalten	25
4. Cu-Gehalt, UV-Spektren und O ₂ -Bindung des Hämocyanins	27
5. Bestimmung der N-terminalen Aminosäure	27
6. Die Eigenschaften des Begleitproteins	29
7. Das Dissoziations-Assoziationsverhalten	30
7.1 Einfluß von pH-Wert, Pufferspezies und Ionenstärke	30
7.2 Die Dissoziation des Hämocyanins	38
7.3 Reassoziationsversuche	40
7.3.1 Reassoziation nach Tris/Borat-Dissoziation	40

7.3.2 Reassoziation nach Bicarbonatdissoziation	41
8. Struktureller und funktioneller Vergleich zwischen nativen und reassozierten Hämocya- ninen	48
8.1 Sedimentationsanalyse	48
8.2 Elektrophoretisches Verhalten	48
8.3 Die Quartärstruktur im elektronenmikros- kopischen Bild	50
8.4 Die Sauerstoffbindung	52
D. DISKUSSION	59
1. Physikalische und chemische Charakteri- sierung von reinen Hämocyaninen	59
2. Das Dissoziations-Assoziationsverhalten	61
2.1 Die pH-Abhängigkeit der Quartärstruktur	61
2.2 Der Einfluß der Ionenstärke	63
2.3 Einfluß von Komplexbildnern und der Pufferspezies	64
2.4 Der Einfluß von Ca^{++} und Mg^{++} und der Proteinkonzentration	65
3. Vergleich zwischen nativen und reassozierten Hämocyaninen	66
E. ZUSAMMENFASSUNG	69
F. LITERATURVERZEICHNIS	72

A . E I N L E I T U N G

Alle respiratorischen Proteine zeigen eine intensive Färbung und werden daher oft als respiratorische Pigmente bezeichnet. Entsprechend der Natur ihrer aktiven Zentren lassen sie sich in drei Klassen einteilen:

1. Die rot gefärbten Häm-Proteine, welche ein Molekül Sauerstoff pro einem Häm-Eisenatom binden. Die Chlorocruorine zeigen zu ihnen eine enge Verwandtschaft; sie unterscheiden sich von Häm-Proteinen nur durch die Modifizierung einer Seitenkette des Porphyrinsystems.
2. Die violett gefärbten Hämyerithrine, welche ein Molekül Sauerstoff pro zwei Eisenatomen, welche aber nicht in einem Porphyrin vorliegen, binden.
3. Die blau gefärbten Hämocyanine, welche ein Molekül Sauerstoff pro zwei Kupferatomen binden.

Allgemein scheint zu gelten, daß nicht zellulär gebundene Atmungspigmente zu Aggregaten von sehr hohen Molgewichten zusammentreten. Dies gilt insbesondere für die Hämocyanine. Hämocyanine sind die respiratorischen Pigmente vieler Arthropoden und Mollusken. Sie treten nur extrazellulär auf und bilden stets Riesenmoleküle mit Molgewichten von 400 000 bis 9 Millionen Dalton. Die kleinste, funktionelle Einheit der Arthropodenhämocyanine besitzt ein Molgewicht von 70-75 000 Dalton, diejenige der Mollusken errechnet sich zu 50 000 Dalton. Arthropodenhämocyanine bauen sich aus kubischen Monomeren (16 S-Einheit, bestehend aus 6 funktionellen Einheiten) auf, welche zu Dimeren (24 S-Einheit) und Tetrameren (37 S-Einheit) zusammentreten können. Arthropodenhämocyanine zerfallen im alkalischen Milieu in die kleinste, funktionelle Untereinheit. Molluskenhämocyanine konnten dagegen bisher noch nicht ohne Spaltung kovalenter Bindungen soweit zerlegt werden.

Die bisherigen Untersuchungen an Arthropodenhämocyaninen beziehen sich fast ausschließlich auf dekapode Crustaceen und den Xiphosuren *Limulus*. Eine weitere große Arthropodengruppe, die Arachniden, wurden demgegenüber weitgehend

vernachlässigt. Loewe (1972) fand bei Untersuchungen der Hämolymphe zweier Spinnen (*Dugesia californica* und *Cupiennius salei*), daß diese Hämocyanin als nahezu einziges Protein enthalten. Untersuchungen zum Dissoziations-Assoziationsverhalten zeigen weiterhin, daß Arachnidenhämocyanine dem Typus der Arthropodenhämocyanine gut entsprechen. Allerdings arbeitete Loewe (1972) lediglich mit dialysierter Hämolymphe einer definierten Ionenstärke.

Die Assoziation der Hämocyanine führt zu einer hochkooperativen Wechselwirkung. Die Hillkoeffizienten bei halbmaximaler Beladung (n_{50}) stellen die höchsten derartigen Werte dar, die an Proteinen gemessen wurden. Die Untereinheiten assoziieren jedoch stufenweise, was durch $6 S \rightleftharpoons 16 S \rightleftharpoons 24 S \rightleftharpoons 37 S$ beschrieben werden kann. Unter physiologischen Bedingungen werden bei einigen Formen nur die 16 S-Partikel gefunden (z.B. Van Bruggen in Ghiretti, 1968; Johnston et al., 1967), bei anderen geht die Assoziation darüber hinaus (z.B. Morimoto und Kegeles, 1971; Carpenter und Van Holde, 1973; Siezen, 1974). Es stellt sich daher die Frage, welche Konsequenzen die weiterführende Assoziation für die Funktion der Sauerstoffbindung hat. Ist dadurch die Sauerstoffaffinität betroffen, die Kooperativität, oder beide? Es war dafür vorweg zu klären, ob die einzelnen Stufen miteinander in einem echten Gleichgewicht stehen, mit anderen Worten, ob aus der kleinsten Einheit ein funktionelles Hämocyanin in vitro rekonstituiert werden kann. Entsprechende Untersuchungen an Hämocyanin aus *Panulirus interruptus* hatten bereits Erfolg (Johnston et al., 1967). Vorversuche von Czichos-Tiedt (1975) machen es wahrscheinlich, daß die Assoziation von 16 S-Hämocyanin aus der Spinne *Cupiennius salei* zu 24 S-Partikeln sehr langsam verläuft. Deshalb schien eine genauere Untersuchung des Dissoziations-Assoziationsverhalten von Spinnenhämocyaninen angebracht. Die Beeinflussung dieses Gleichgewichts durch verschiedene Effektoren (H^+ , Ca^{++} , Mg^{++}) sowie durch Veränderung der Proteinkonzentration war von besonderem Interesse. Dies setzt wiederum voraus, daß hinsichtlich ihres Assoziationszustandes definierte Hämocya-

nine isoliert und ausreichend physikalisch und chemisch charakterisiert werden. Derartige Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit begonnen.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien

Alle Reagentien waren von p. A. Qualität. Sie wurden von Merck bezogen, mit Ausnahme von:

Acrylamid Schuchardt, München

N, N-Methylenbisacryl-
amid

Coomassie Brilliant Blue Serva, Heidelberg

PTH-Aminosäuren

Schichtkarten zur Dünnschichtchromatographie
mit Fluoreszenzindikator

N, N-Dimethylallylamin

Sephadex G-150 Pharmacia, Uppsala
Schweden

Ampholine für die Isoelektrofokussierung LKB-Produkte, Bromma
Schweden

Magnesium-Rapid-Stat-Kit Pierce-Chemical-Company,
Rockford Illinois, USA

Phenylisothiocyanat Roth OHG, Karlsruhe

Essigsäurebutylester Fluka AG, Neu-Ulm

Formamid puriss. p. A.

Biogel A5m Biorad, Richmond
Californien, USA

Stickstoff Linde, München

Höhenatemsauerstoff

2. Tiere und Tierhaltung

Die Haltung von *Dugesia californica* und *Eurypelma helluo*, zweier Vogelspinnenarten, welche im Süden und Südwesten der USA sehr verbreitet sind, wurde schon früher beschrieben

(Loewe, 1972). Die Tiere wurden ungeachtet ihres Geschlechts und Alters für die Versuche verwendet. *Cupiennius salei* Keyserling, eine mittelamerikanische Kammspinnenart, wurde nach den Angaben von Melchers (1963) und Loewe et al. (1970) gezüchtet. Bei dieser Art wurde die Hämolymphe durchwegs aus adulten Weibchen gewonnen.

3. Entnahme der Hämolymphe

Die durch Punktion des dorsal gelegenen Herzens erhaltene Hämolymphe wurde durch 30-minütiges Abzentrifugieren bei 10 000 UPM/4°C zellfrei gemacht. Damit wird gleichzeitig ihre Gerinnung verhindert. Durch 24-stündige Zentrifugation bei 46 000 UPM/5°C in einer Beckman Ultrazentrifuge, Typ L-2, wurde ein Hämocyanin- " Pellet " erhalten. Es wurde in Tris/HCl-Puffer (0,01 M), pH 7,5, aufgenommen.

4. Puffer

Dissoziationsversuche wurden mit Bicarbonatpuffer nach Long (1961), Ionenstärke 0,1 (pH 9,1 bis 9,75) und Tris/Borat-Puffer pH 9,6-9,75 (0,13 M bzw. 0,26 M) durchgeführt.

Zur Untersuchung von Dissoziations-Assoziationsgleichgewichten wurden folgende Puffer der Ionenstärke 0,1 (z.T. I 0,05) verwendet (Long, 1961) : Na/K-Phosphatpuffer (pH 5,8-7,9), Tris/HCl-Puffer (7,8-9,0) und Bicarbonatpuffer (pH 9,0-9,75).

Zur Reassoziatio dienten: Tris/HCl-Puffer pH 7,5 (0,01 M) enthaltend 0, 1, 10 und 100 mM Mg^{++} , bzw. 4 und 40 mM Ca^{++} , sowie 1 mM Mg^{++} /4 mM Ca^{++} , sowie Tris/HCl-Puffer (nach Long) der Ionenstärke 0,1 (pH 8,2), enthaltend 40mM Ca^{++} , und Diäthylbarbitursäure/Tris-Puffer pH 7,5 (0,01 M).

5. Quantitative Bestimmungen

5.1 pH-Wert der Hämolymphe

Sie erfolgte mit einem Knick Präzisions pH-Meter Typ 34 und einer Halbmikro-Glaselektrode der Firma Pusl. Zur Bestimmung wurde zellfreie, ungeronnene Hämolymphe (Probe-

volumen ca. 500 μ l) verwendet.

5.2 Protein

Für photometrische Messungen wurde die Hämocyaneinichkurve von Loewe (1972) zugrundegelegt, wobei näherungsweise eine Extinktionseinheit 1 mg Protein pro ml entspricht. Ergänzend wurde, soweit erforderlich, Protein nach Lowry et al. (1951) bestimmt.

5.3 Gesamtmagnesium

Zur Bestimmung des Gesamtmagnesiums wurden mehrere Methoden erprobt. Die Methoden nach Martinek und Berry (1964) sowie nach Mattenheimer (1966) liefern in Folge der zu geringen Spezifität des Titangelbs zu hohe und außerdem schlecht reproduzierbare Werte. Die Bestimmung erfolgte endgültig nach Gindler und Heth (1971). Unumgängliche Notwendigkeit ist die Verwendung komplexbildnerfreier Arbeitsutensilien.

5.4 Gesamtkalzium

Mittels des Kalzium-Rapid-Stat-Kit der Firma Pierce-Chemical-Company; auch hier gelten die oben genannten Vorsichtsmaßnahmen.

5.5 Kupfer

Die Bestimmung erfolgte durch Atomabsorptionsspektroskopie, mit einem Gerät der Firma Perkin-Elmer, Typ 400. Die Versuchsbedingungen entsprachen den Angaben des Herstellers.

6. Gefrieretrocknung

Verwendet wurde ein Büchi-Rotavapor mit aufgesetzter Kühlfalle. Als Kühlmittel diente eine Methanol-Trockeneismischung.

7. Elektrophoresen

7.1 Analytische Discelektrophorese im Polyacrylamidgel

Elektrophorese in Gegenwart von 6 M Harnstoff und EDTA (7 mM) bei pH 9,6 erfolgte nach den Angaben von Kaltschmidt und Wittmann (1971). Anfänglich wurden die Elektrophoresen mit 3-proz. Sammelgel und 3-proz. Trenngel, später mit 4-proz. Sammelgel und 6-proz. Trenngel durchgeführt. Die optimalen Bedingungen waren 2 bzw. 3

Stunden Laufzeit bei einer Stromstärke von 5 mA pro Gel. Die Spannung bewegte sich im Bereich von 100 V. Elektrophoresen im neutralen pH-Bereich erfolgten nach Maurer (1968; System 6). Die Gele waren 5-prozentig, ohne Sammelgel; als Elektrodenpuffer diente Diäthylbarbitursäure/Tris pH 7,0 (0,01 M), als Trenngelpuffer wurde Tris/HCl-Puffer pH 7,5 (0,05 M) eingesetzt. Die Läufe erfolgten bei 3 mA pro Gel und bei Zimmertemperatur. Zur Frontmarkierung wurde Bromphenolblau verwendet. Die aufgetragene Proteinmenge betrug etwa 100 γ pro Gel.

7.2 Analytische Discelektrophorese im Agarose-Acrylamidgel

Am besten bewährte sich ein System, welches eine Kombination des veränderten Systems 6 nach Maurer (1968) und einer im selben Buch angegebenen Kurzinformation zur Herstellung von Agarosegelen, darstellt.

Gelzusammensetzung:

Acrylamid: 2,7- 4 %; am besten bewährten sich 3,5 proz. Gele.

Bisacrylamid: 0,14 %

Agarose: 0,65 %

Gelpuffer: Tris/HCl-Puffer pH 7,5 (0,01 M)

Elektrodenpuffer: Diäthylbarbitursäure/Tris pH 7,0
(0,03 M)

Elektrophorese: 20 Minuten bei 200 V (konst.)

7.3 Anfärbung und Auswertung der Gele

Die Banden wurden mit Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bramhall, 1969; Weber und Osborn, 1969) angefärbt. Die Gele wurden mit Hilfe einer von der Werkstatt des Institutes gebauten Apparatur densitometrisch ausgewertet. Die Extinktion bei 546 nm wurde von einem log-Schreiber aufgezeichnet und elektronisch integriert.

7.4 Korrelation zwischen Bandenmuster und Sedimentationskonstanten

Zu diesem Zweck wurden 10 μ l Hämolymphe mit 1 ml Elektroden- bzw. Gelpuffer verdünnt und mittels analytischer Ultrazentrifugation die Sedimentationskoeffizienten der vor-

liegenden Komponenten ermittelt. Ergänzend wurden " Schneideversuche " durchgeführt: 10 μ l Hämolymphe wurden auf lange Gelröhrchen (0,6 mal 14 cm) aufgetragen und im analytischen Discelektrophoresesystem getrennt. Anschließend wurden die Gele halbiert und jeweils eine Gelhälfte mit Coomassie Brilliant Blue angefärbt. Nach der Anfärbung wurden entsprechende Gelabschnitte aus der unbehandelten Gelhälfte herausgeschnitten, in 200 μ l Elektroden- bzw. Gelpuffer homogenisiert, über Nacht eluiert und anschließend zentrifugiert. Die Eluate wurden in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht.

8. Trägerfreie Isoelektrofokussierung nach Macko und Stegemann (1970)

Für die Versuche wurden 10-15 mg Protein eingesetzt. Die Experimente wurden in einem um ein Kupferrohr gewickelten Silikonschlauch (120 cm Länge, 4 mm i. D.) durchgeführt, welcher in Abständen von 2,5 cm markiert wurde. Die Fokussierung erfolgte in einem pH-Bereich von pH 4-6. Die angelegte Spannung betrug anfangs 600 V und wurde im weiteren Verlauf auf 1000 V erhöht. Nach erfolgreicher Fokussierung (7-14 Tage) wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, wonach der Schlauch in 2,5 cm lange Segmente zerschnitten wurde. In jeder Fraktion wurde die Extinktion bei 280 und 340 nm und der pH-Wert bestimmt. Die Fraktionen wurden anschließend im analytischen Discelektrophoresesystem und nach Dialyse in der analytischen Ultrazentrifuge untersucht.

9. Chromatographische Methoden

9.1 Chromatographie über Sepharose 4B-200

200 μ l Hämolymphe wurden auf eine Säule von 0,9 mal 100 cm aufgetragen. Equilibriert und eluiert wurde mit Tris/HCl-Puffer pH 7,5 (0,01 M), enthaltend 1 mM Mg^{++} . Die Fraktionsgröße lag bei 1,5 ml.

9.2 Chromatographie über Biogel A5m (200-400 mesh)

Auf Säulen von 0,9 mal 100 cm bzw. 0,9 mal 150 cm wurden 200-300 μ l Hämolymphe aufgetragen. Versuchsbedingungen wie unter 9.1. Die Fraktionen wurden mittels analytischer Disc-

elektrophorese und analytischer Ultrazentrifugation untersucht.

9.3 Chromatographie über Sephadex

Sephadex G 150 wurde über Nacht gequollen, im kochenden Wasserbad ca. 2 Stunden erhitzt und anschließend in eine Säule 0,5 mal 130 cm gefüllt. Equilibriert und eluiert wurde mit Bicarbonatpuffer pH 9,6, Ionenstärke 0,1 (Long, 1961). Untersuchungen der Fraktionen vgl. 9.2.

10. Dichtegradientenzentrifugation

Die Versuche wurden mit einer präparativen Ultrazentrifuge, Typ Beckman L-2, durchgeführt. Die Saccharosegradienten wurden mittels eines Gradientenmischers der Firma Hölzel, Dorfen, hergestellt und über Nacht bei 5°C stehen gelassen. Nach vorsichtigem Auftragen von 25-100 µl Hämolymphe wurde mit 39 000-40 000 UPM im Rotor SW 41 Ti, bei 5°C über einen Zeitraum von 3 bis 6 Stunden zentrifugiert. Die Fraktionierung erfolgte entweder durch Austropfen der am Boden punktierten Röhrchen oder durch Absaugen von oben mittels Eppendorfpipette. Es wurden zwischen 20 und 25 Fraktionen von jeweils 500 µl gesammelt und ihre Extinktionen bei 280 nm gemessen. Anschließend wurden sie durch analytische Discelektrophorese und analytische Ultrazentrifugation untersucht. Verwendung fanden Gradienten einer Konzentration von 5-20, 5-25 und 10-30 % Saccharose. Als Puffer diente Tris/HCl-Puffer, pH 7,5 (0,01 M), enthaltend 0, 1 und 10 mM Mg⁺⁺, und Tris-Borat-Puffer pH 9,6 (0,26 M).

11. Verhalten in der analytischen Ultrazentrifuge

Benützt wurde eine analytische Ultrazentrifuge, Typ Beckman Model E, ausgerüstet mit einem photoelektrischen Scanner und Multiplexer. Ein eingebauter Monochromator ermöglicht es, die Absorption bei verschiedenen Wellenlängen zu registrieren.

11.1 Sedimentationsanalysen

11.1.1 " Moving boundary " -Methode

Es wurden ausschließlich Doppelsektorzellen mit Kel-F- oder Filled-Epon-Mittelstücken verwendet. Die Läufe erfolgten bei 20°C (z. T. bei 25°C). Die Umdrehungsgeschwindigkeit betrug zwischen 30- und 40 000 UPM. Die Absorption wurde entsprechend der Proteinkonzentration bei verschiedenen Wellenlängen aufgezeichnet:

Proteinkonzentration (mg/ml)	Wellenlänge λ' (nm)
0,03 - 1	230
0,1 - 2,0	280
2,0 - 6,0	340
50,0 (konz. Hämolymphe)	560

11.1.2 Bandsedimentation nach Vinograd (1963)

Die Versuche wurden unter Verwendung eines Vinograd-Mittelstückes bei 20°C durchgeführt. Der pH-Wert der Gradientenlösung (pH 8,6) wurde mit 1 N HCl auf pH 7,5 eingestellt. Die Proteinkonzentration lag bei 2 mg/ml, die Wellenlänge betrug 280 nm. Nach Ausbildung des Gradienten wurde die Geschwindigkeit von 10-12 000 auf 30-40 000 UPM (verschiedene Versuche) erhöht.

11.1.3 Bestimmung der Sedimentationskonstanten

Die Bestimmung der Sedimentationskoeffizienten erfolgte nach dem üblichen graphischen Verfahren (Elias, 1969) aus der Gleichung:

$$(s_c)_{app} = \frac{2,303}{\omega^2} \cdot \frac{d \log r}{dt}$$

Aus dem apparenten Sedimentationskoeffizienten kann durch Multiplikation mit drei Korrekturfaktoren die Sedimentationskonstante $s_{20, w}^c$ berechnet werden:

$$(s_{20, w})_c = (s_{t, LM})_c \cdot \frac{\eta_{t, w}}{\eta_{20, w}} \cdot \frac{\eta_{t, Lsg}}{\eta_{t, w}} \cdot$$

$$\cdot \frac{(1 - v_{20,w} \cdot \rho_{20,w})}{(1 - v_{t,LM} \cdot \rho_{t,Lsg})}$$

In dieser Gleichung bedeuten:

- $(s_{20,w})_c$ = Sedimentationskoeffizient unter Standardbedingungen (20°C und Wasser) bei der Konzentration c
- $(s_{t,LM})_c$ = Sedimentationskoeffizient unter Meßbedingungen (t°C, Lösungsmittel LM, Konzentration c)
- η_{tw} = Viskosität des Wassers bei der Temperatur t°C
- $\eta_{20,w}$ = Viskosität der Wassers bei 20°C
- $\eta_{t,Lsg}$ = Viskosität der Lösung bei t°C
- $v_{20,w}$ = partielles spezifisches Volumen des Gelösten bei 20°C in Wasser
- $v_{t,LM}$ = partielles spezifisches Volumen des Gelösten bei t°C im Lösungsmittel
- $\rho_{20,w}$ = Dichte des Wassers bei 20°C
- $\rho_{t,Lsg}$ = Dichte der Lösung bei t°C

Auf eine Extrapolation auf unendliche Verdünnung (c=0) konnte verzichtet werden, da die Versuche bei sehr niedrigen Proteinkonzentrationen (0,5 mg/ml) durchgeführt wurden (vgl. Chervenka, 1973).

11.2 Molekulargewichtsbestimmungen

Die Bestimmung der Molekulargewichte wurde nach Yphantis (1960) durchgeführt. Verwendet wurden 6-Kanal-Mittelstücke, die Geschwindigkeit betrug 10- bzw. 12 000 UPM bei einer Temperatur von 20°C. Nach ca. 20 Stunden war die Einstellung des Sedimentations-Diffusions-Gleichge-

wichts erreicht. Das apparente Molekulargewicht ergibt sich aus der Gleichung:

$$M_{\text{app}} = \frac{2 R T}{(1 - v \cdot \rho)} \cdot \frac{2,303}{\omega^2} \cdot \frac{d \log E}{d r_1^2}$$

R = Allgemeine Gaskonstante ($8,313 \cdot 10^7$ erg. grad $^{-1}$. mol $^{-1}$)

T = Versuchstemperatur in $^{\circ}\text{K}$

E = Extinktion

Durch graphische Extrapolation auf unendliche Verdünnung wird aus dem apparenten Molekulargewicht die konzentrations-unabhängige Molekulargewichtskonstante M. Auf eine derartige Korrektur konnte verzichtet werden, da die Versuche bei niedrigen Proteinkonzentrationen (0,2-0,3 mg/ml) stattfanden.

11.3 Zusatzmessungen

11.3.1 Dichtemessung

Die Bestimmung der Dichte wurde mit einer digitalen Präzisionsdichtemeßapparatur, Typ DMA 02/C, der Firma Heraeus-Paar, nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Thermostatisierung bei $20^{\circ}\text{C} \pm 0,005^{\circ}\text{C}$ erfolgte durch zwei hintereinandergeschaltete Thermostaten der Firma Haake, Berlin.

11.3.2 Viskositätsbestimmung

Zur Viskosimetrie wurde ein Ubbelohde-Viskosimeter mit hängendem Kugelniveau (Jenaer Glaswerk Schott u. Gen., Mainz) verwendet. Temperaturkonstanz bei 20°C wurde analog 11.3.1 erreicht.

11.3.3 Bestimmung des partiellen spezifischen Volumen

Das partielle spezifische Volumen wurde aus der quantitativen Aminosäureanalyse (Markl, 1976) nach Haschenmeyer (1973) berechnet.

11.4 Dissoziationsversuche

Zu diesem Zweck wurden Proben einer Proteinkonzentration von 0,3-50,0 mg/ml 2-3 Tage bei 5°C , bzw. 25°C gegen einen

tausendfachen Überschuß des jeweiligen Puffers dialysiert. Die Quantifizierung der Dissoziation erfolgte mittels analytischer Ultrazentrifugation. Ergänzend wurden in einigen Fällen elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Zur Aufnahme von Dissoziationskinetiken wurde für den Zeitraum 0-80 Minuten eine Modifizierung der Bandsedimentation nach Vinograd (1963) angewandt. Als Gradientenlösung diente Bicarbonatpuffer pH 9,6 (1 M NaCl bzw. 10 % Saccharose) nach Long (Ionenstärke 0,1). Durch Konzentrieren der Proteinlösungen mittels Membranfiltration (Mini-Kon-Elemente der Firma Amicon) und anschließende Aufnahme im gewünschten Puffer war eine Beobachtung der Dissoziation ab 80 Minuten nach Milieuwechsel möglich. Die Prozentsätze der zu jedem Zeitpunkt vorliegenden Komponenten wurden durch analytische Ultrazentrifugation ermittelt (Sedimentationsläufe bei hohen Touren).

11.5 Dissoziations-Assoziationsgleichgewichte

Untersucht wurde die Abhängigkeit des Dissoziationsgrades vom pH-Wert, der Temperatur, der Proteinkonzentration und der Pufferspezies. Gleichgewichtsverschiebungen unter Veränderung der Ionenstärke wurden nur bei einzelnen pH-Werten untersucht.

11.6 Reassoziationsversuche

Proben einer Proteinkonzentration von 0,025 bis 6 mg/ml wurden zwischen einem und 20 Tagen bei 25°C gegen "Reassoziationspuffer" dialysiert. Es wurde die Abhängigkeit der Reaggregation vom pH-Wert, der Proteinkonzentration, der Pufferspezies, der Konzentration von Mg^{++} und Ca^{++} und der Zeit (Reassoziationskinetik) erstellt. Zur Aufnahme von O_2 -Bindungskurven an Reassoziaten wurde die Aggregation am vorgesehenen Zeitpunkt abgebrochen und die vorliegenden Komponenten über Biogel A5m chromatographisch getrennt. Im Falle quantitativer Reassoziationsversuche wurden die Proben ebenfalls auf Biogel aufgetragen, um niedermolekulare Verunreinigungen zu entfernen. Die Untersuchungen wurden mit analytischer Discelektrophorese und analytischer Ultrazentrifugation durchgeführt.

12. Messung von Sauerstoffbindungskurven

Sauerstoffbindungskurven wurden an Hämolymphe, reinen Komponenten und reassozierten Komponenten bei verschiedenen pH-Werten aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug zwischen 1,5 und 2,5 mg/ml. Die Durchführung der Messungen erfolgte nach Loewe und Linzen (1975).

13. Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden von Frau Dr. Loewe im Laboratorium von Prof. E. Van Bruggen, Groningen, durchgeführt. Hämolymphe, Reinkomponenten und Reassoziat einer Proteinkonzentration von 0,1-0,4 mg/ml wurden auf Kupfernetze mit 60-70 Å starken Kohlefilmen aufgezogen und nach Brenner und Horne (1959) negativ kontrastiert. Dazu wurde 1-proz. Uranylacetat, pH 5, verwendet. Die Aufnahmen erfolgten mit Geräten der Firma Philips, Typ 200 B, und der Firma Jeol, Typ IEM 100 B. Die Primärvergrößerung war 28 500- bzw. 60 000-fach. Film: Eastman-Kodak fine grain release positive film 5302; Platten: Kodak Elektron image plates.

14. Endgruppenbestimmung

Die qualitative Analyse der N-terminalen Aminosäure geschah durch Anwendung der Phenylisothiocyanat-Methode nach Edman (1950). Untersucht wurden Hämolymphe, dialysierte Hämolymphe, Hämocyanin und Begleitprotein, wobei ca. 7-70 mg Protein (0,1-1 μ Mol) pro Ansatz eingesetzt wurden. Die Proben wurden gefriergetrocknet und anschließend in alkalischer Lösung mit Phenylsenföhl umgesetzt. Anlagerung von Phenylsenföhl an die freie α -Aminogruppe des Peptids, zyklisierende Spaltung unter stark sauren Bedingungen (200 μ l Trifluoroessigsäure) und Konversion des trockenen Thiazolons zu dem Phenylthiohydantoinderivat der N-terminalen Aminosäure erfolgten sämtlich genau nach Edman (1950). Zur Untersuchung der organischen Phase wurden die folgenden Chromatographiesysteme (Needleman, 1970) verwendet: 1. System: Propionsäuretertiärbutylester. 2. System: Äthylenchlorid/

Essigsäure (15:2). 3. System: n-Butylacetat/Propionsäure/Formamid (60:1,8:8). Zur Chromatographie der wässrigen Phase diente das System Äthanol/Xylol/Essigsäure (50:50:0,5). Die PTH-Aminosäuren wurden dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten (10 mal 10 cm) mit Fluoreszenzindikator aufgetrennt. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich der Laufstrecken und durch spezifische Farbreaktionen.

C. E R G E B N I S S E

1. Vorversuche

1.1 Das Proteinmuster der Gesamthämolymphe

Die Hämolympheproteine aus Vogel- und Kammspinnen wurden ohne Vorbehandlung, nach Dialyse bzw. Ultrafiltration in Abhängigkeit verschiedener Parameter, einer discelektrophoretischen Auftrennung im Polyacrylamidgel unterworfen. Mittels Ultrafiltration war eine ungefähre Abschätzung der Molgewichte der filtrierte Proteine möglich. Analytische Ultrazentrifugation der auftretenden Einheiten im Gel- bzw. Elektrodenpuffer des entsprechenden Discelektrophoresesystems, ergänzt durch Schneideversuche, ermöglichten eine Korrelation zwischen Bandenmuster in der analytischen Discelektrophorese und Sedimentationskonstanten.

Auftrennung von Cupiennius-Hämolymphe im System 6 nach Maurer (Czichos-Tiedt, 1975), ergibt drei Hauptbanden, welche im Verhältnis 50 : 25 : 25 Prozent auftreten und mit Sedimentationskonstanten von 24 S und 16 S sedimentieren (Abb. 1). Die beiden 16 S-Banden stellen wie im weiteren Verlauf der Arbeit bewiesen wird, keine zwei Hämocyaninspezies dar, sondern Hämocyanin (HCy) und ein Begleitprotein (BP) mit noch unbekannter Funktion. Eine Untersuchung von Hämolymphe aus Vogelspinnen zeigt, daß

in diesem Fall neben 82 % Hämocyanin (37 S-Einheit) noch 18 % eines ebenfalls mit 16 S sedimentierenden Begleitproteins auftreten (Abb. 1 b).

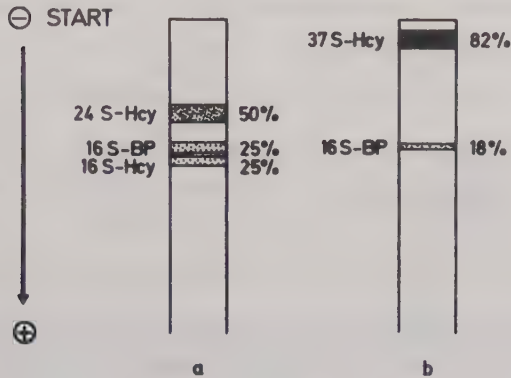


Abb. 1: Auftrennung der Hämolympheproteine im System 6 nach Maurer (1968); 5-proz. Gel, 60 Min.
a.) *Cupiennius salei*
b.) *Dugesia californica* (*Eurypelma helluo*)

Die Elektrophoresen im neutralen pH-Bereich wurden durch Untersuchungen im alkalischen Dissoziationsbereich der Hämocyane (Loewe, 1972) ergänzt. Das Hämocyanin aus *Cupiennius* zeigte nach Zentrifugation in der präparativen Ultrazentrifuge (Darstellung des Pellets) und anschließende Dialyse und Ultrafiltration im System nach Kaltschmidt und Wittmann (1971) eine einzige Bande, welche mit 5 S sedimentierte.

1.2 Bestimmung von Gesamtkalzium und -magnesium

Die Struktur der Hämocyane wird von der Anwesenheit zweiwertiger Kationen, wie Ca^{++} und Mg^{++} , beeinflusst (vgl. Loewe und Linzen, 1973, 1975). Daher wurden als

nächstes die Konzentrationen von Gesamtmagnesium und -calcium in der Hämolymphe der Versuchstiere bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Konzentrationen von Ca^{++} und Mg^{++} in Spinnen-hämolymphe; Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen.

Untersuchungsobjekt	n	Ca^{++} (mM)	Mg^{++} (mM)
Cupiennius salei	8	$3,50 \pm 0,03$	$0,83 \pm 0,02$
Dugesia californica	4	$4,00 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,03$
Eurypelma helluo	4	$3,60 \pm 0,03$	$0,83 \pm 0,02$

Die Werte für Gesamtkalzium stehen in gutem Einklang mit Versuchen von Loewe et al. (1970), welche mit Hilfe einer anderen Methode bei Cupiennius salei einen Wert von 4 mM bestimmten.

2. Isolierung und Charakterisierung von reinen 37 S-, 24 S-, 16 S-, 6 S- und 5 S-Hämocyaninkomponenten

2.1 Zentrifugation im Dichtegradienten

Die stark unterschiedlichen Sedimentationskonstanten von 37 S und 16 S ermöglichen eine Abtrennung des Vogelspinnenhämocyanins vom Begleitprotein mittels Dichtegradientenzentrifugation. Am besten bewährte sich ein kontinuierlicher Gradient von 10-30 % Saccharose (pH 7,5, 1 mM Mg^{++}) bei einer Laufzeit von 6 Stunden bei 5°C (Abb. 2). Durch analytische Discelektrophorese und analytische Ultrazentrifugation wurde gezeigt, daß in den Fraktionen bis zum Maximum des ersten Gipfels (F 12) reines 37 S-Hämocyanin, ab Fraktion 17 reines Begleitprotein vorliegt.

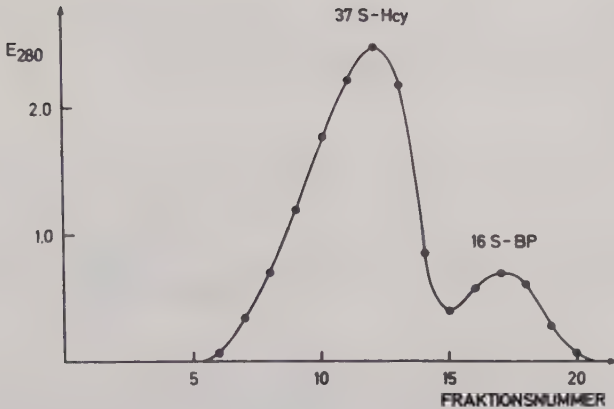


Abb. 2: Extinktionsverlauf in den Fraktionen nach Zentrifugation von Dugesiella- bzw. Eurypelma-Hämolymphe in einem Rohrzuckergradienten 10-30 %, Rotor SW 41 Ti, 39 000 UPM, 6 Stunden, 5 °C.

Um die bei Dissoziation des Vogelspinnenhämocyanins auftretenden hochmolekularen Zwischenstufen (33 S, 27 S; vgl. 7) anzureichern wurde Hämolymphe in einem Rohrzuckergradienten von 5-25 % Saccharose, pH 9,6, während 290 Minuten bei 39 000 UPM/5 °C zentrifugiert. Das nach Ausmessen der Fraktionen erhaltene Elutionsmuster war aber wider Erwarten zwei- und nicht mehrgipfelig. Eine Isolierung der hochmolekularen Zwischenstufen ist also auf diese Weise nicht möglich.

Um 24 S-Hämocyanin aus Cupiennius salei zu gewinnen, wurde Hämolymphe in einem Gradienten von 5-20 % Saccharose (pH 7,5, 1 mM Mg⁺⁺) sechs Stunden bei 41 000 UPM und 5 °C zentrifugiert. Die anschließende Analyse zeigt, daß bis Fraktion 10 reines 16 S-, ab Fraktion 14 reines 24 S-Hämocyanin vorliegt (In diesem Fall erfolgte die Fraktionierung durch Absaugen mittels Eppendorfpipette). Das Ergebnis dieser Trennung zeigt Abbildung 3 (Seite 18).

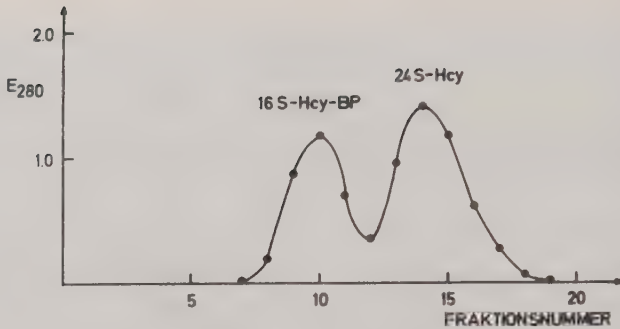


Abb. 3: Extinktionsverlauf in den Fraktionen nach Zentrifugation von *Cupiennius*-Hämolymphe in einem Gradienten von 5-20 % Saccharose, Rotor SW 41 Ti, 41 000 UPM, 6 Stunden, 5 °C.

2.2 Gelfiltration

Roxby et al. (1974) trennten 39 S- und 17 S-Hämocyanin aus *Callinassa californiensis* durch Chromatographie über Bio-gel A 5m. Mit dem gleichen Verfahren wurde über eine Säule von 0,9 mal 100 cm das Hämocyanin aus *Dugesia* vom Begleitprotein abgetrennt (Abb. 4a).

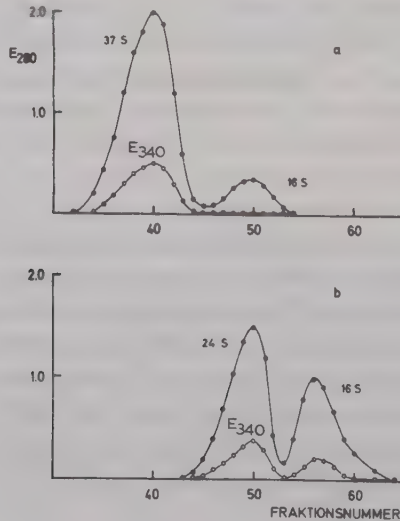


Abb. 4: Extinktionsverlauf in den Fraktionen nach Chromatographie über Biogel A 5m, 200-400 mesh.
a.) Hämolymphe aus Vogelspinnen, Säule 0,9 x 100 cm
b.) Hämolymphe aus *Cupiennius salei*, Säule 0,9 x 150 cm

Durch Verlängerung der Säule auf 150 cm konnten auch die 24 S- und 16 S-Proteine aus *Cupiennius*-Hämolymphe getrennt werden. (Abb. 4b).

Es sei noch erwähnt, daß Chromatographie über Sepharose 4 B-200 keine befriedigenden Trennungen ergab.

Ein zweiter Weg zur Abtrennung des Begleitproteins ergibt sich durch vollständige Dissoziation des Hämocyanins und nachfolgende Gelchromatographie. Dazu wurde Hämolymphe aus *Cupiennius salei* oder die Mischung aus 16 S-Hämocyanin und Begleitprotein zwei Tage bei 25 °C gegen Bicarbonatpuffer pH 9,6 (I 0,1) dialysiert. Unter diesen Bedingungen dissoziiert das Hämocyanin quantitativ in die kleinste Untereinheit, während das 16 S-Begleitprotein unverändert vorliegt (vgl. 7.1). Anschließende Chromatographie über Sephadex G 150 führte zu folgendem Elutionsdiagramm:

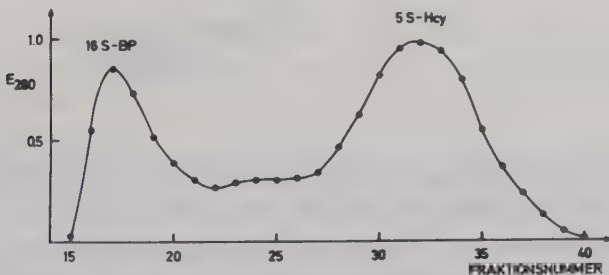


Abb. 5: Extinktionsverlauf in den Fraktionen nach Chromatographie von *Cupiennius*-Hämolymphe nach Dialyse gegen Bicarbonatpuffer, pH 9,6, über Sephadex G 150.

Analytische Untersuchungen zeigen, daß bis Fraktion 17 reines Begleitprotein, ab Fraktion 30 reines 5 S-Hämocyanin

vorliegen. Auf dem gleichen Weg können Hämocyanin und Begleitprotein aus *Dugesia* getrennt werden.

2.3 Isoelektrofokussierung

Diese Methode erlaubt die Auftrennung von Proteinen, innerhalb eines pH-Gradienten, entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt. Der pH-Gradient wird entweder durch Saccharose oder Acryamidgel stabilisiert.

Hämolympe aus Vogelspinnen wurde mittels trägerfreier Isoelektrofokussierung (Macko und Stegemann, 1970) im pH-Bereich 4-6 analysiert (Abb. 6).

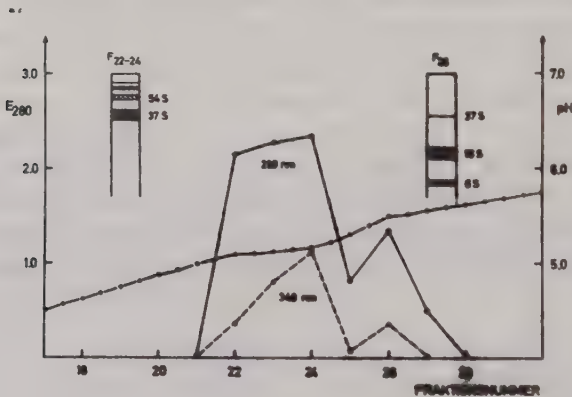


Abb. 6: Trägerfreie Isoelektrofokussierung von Hämolympe aus *Dugesia* im pH-Bereich 4-6. Die gestrichelte Linie zeigt den Verlauf des pH-Gradienten.

Analytische Discelektrophorese im Agarose-Acrylamidgel zeigte, daß in den Fraktionen 22-24 neben der 37 S-Einheit (55 %) noch drei weitere, noch höher assoziierte Komponenten im Verhältnis von 26 : 11 : 8 % vorliegen. Die dem 37 S-Hämocyanin folgende Bande hatte eine Sedimentationskonstante von 54 S. Es dürfte sich dabei um das Dimer der 37 S-Einheit handeln (Abb. 7). Die weiter-

en Banden sedimentierten in der analytischen Ultrazentrifuge zu rasch. Interessanterweise stellt 56 S-Hämocyanin die Proteinhauptkomponente bei *Limulus polyphemus* dar (Van Bruggen in Ghiretti, 1968). In den Fraktionen 25 mit

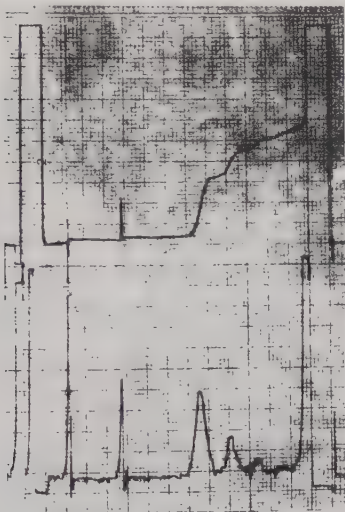


Abb. 7: Analytische Ultrazentrifugation von Fraktion 22, 34 000 UPM, 20 °C, UV-Scanner, nach 24 Minuten. Komponenten von links: 37 S, 54 S, zwei noch höher assoziierte Aggregate.

27 der Isoelektrofokussierung liegen zusehends abnehmende Mengen der 37 S-Einheit, daneben noch 16 S-Begleitprotein und 6 S-Hämocyanin vor (in Fraktion 26: 7 % 37 S, 70 % 16 S, 23 % 6 S).

Durch Isoelektrofokussierung von reinem 37 S-Hämocyanin wurde bewiesen, daß die vorliegende 6 S-Einheit ausschließlich Hämocyanin darstellt, da sie durch Dissoziation aus 37 S-Hämocyanin entsteht. Das Begleitprotein zeigt unter den Bedingungen der Isoelektrofokussierung keine Dissoziationerscheinungen.

Trägerfreie Isoelektrofokussierung von *Cupiennius*-Hämolymphe, im pH-Bereich 4-6, ergab ein zweigipfeliges Elutionsdiagramm, wobei im ersten Gipfel das Hämocyanin

wiedergefunden wurde. Es lag in Form von 16 S-Partikeln, teilweise in der 5 S-Form vor. Im absteigenden Ast von Gipfel 1 kommt es zu einer zunehmenden Verunreinigung der Fraktionen durch 16 S-Begleitprotein, welches die Hauptmenge des zweiten Gipfels bildet. 5 S-Hämocyanin findet sich im pH-Bereich von pH 4,8-5,6. Die aus mehreren Versuchen ermittelten I.E.P.-Werte sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der aus mehreren Versuchen ermittelten I.E.P.-Werte bzw. pH-Bereiche innerhalb welcher die Hämolympheproteine bei Isoelektrofokussierung auftreten.

Untersuchungsobjekt	Auf tretende Komponenten mit I.E.P			
	37 S	16 S	16 S-BP	5/6 S
<u>Dugesiella:</u>				
Hämolymphe	5,1	--	5,5	5,1-5,5
37 S-HCy	5,0	--	--	5,1-5,5
<u>Eurypelma:</u>				
Hämolymphe	5,0	--	5,5	5,0-5,5
<u>Cupiennius:</u>				
Hämolymphe	--	5,2	5,6	4,8-5,6

2.4 Sedimentationsanalyse

2.4.1 Bestimmung von Sedimentationskonstanten

Sedimentationskoeffizienten wurden sowohl unter Einsatz von Hämolymphe als auch von Reinkomponenten mittels der üblichen Moving-boundary-Methode bestimmt. Ergänzend wurden Bestimmungen durch Bandsedimentation nach Vinograd durchgeführt. Nach Korrektur ergeben sich für Hämocyanin aus *Dugesiella californica* (*Eurypelma helluo*) folgende Sedimentationskonstanten, $s_{20,w}^0$: 36,7 S, 5,8 S;

für Hämocyanin aus *Cupiennius* findet man entsprechend 23,4 S, 15,9 S und 4,7 S. Für die Begleitproteine findet man Sedimentationskonstanten von 16,1 S (*Dugesia*) und 15,9 S (*Cupiennius*). Diese Werte präzisieren die Ergebnisse von Loewe (1972). Diese Ergebnisse werden durch die Abbildungen 8 mit 11 dokumentiert.

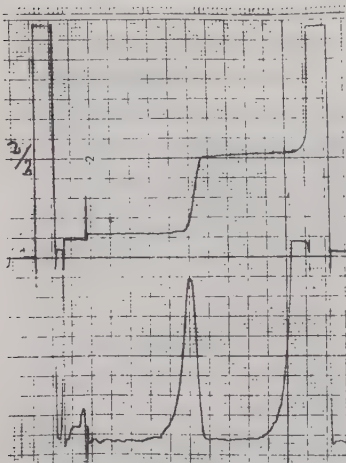


Abb. 8: 37 S-HCy, UV-Scanner, nach 24 Min., 20°C, 40 000 UPM.

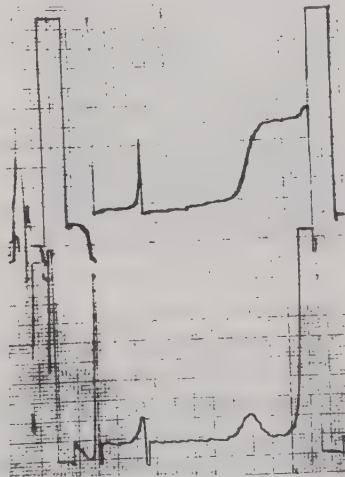


Abb. 9: 16 S-BP, *Dugesia*, UV-Scanner, nach 48 Min., 44 000 UPM, 20°C.

Abb. 10: *Cupiennius*-Hämolymph, Bandsedimentation nach Vinograd, UV-Scanner, nach 10 Min./12 000 und 36 Min./40 000 UPM, 20°C.

Abb. 11: 24 S-Hämocyanin, UV-Scanner, nach 16 Min., 40 000 UPM, 20°C.

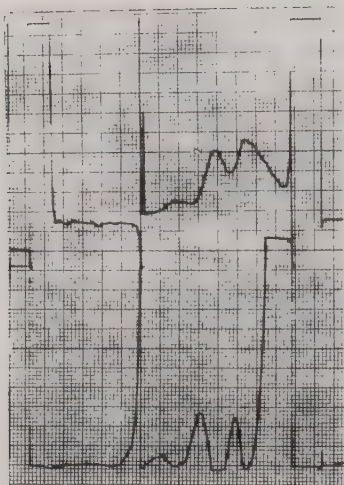


Abb. 10

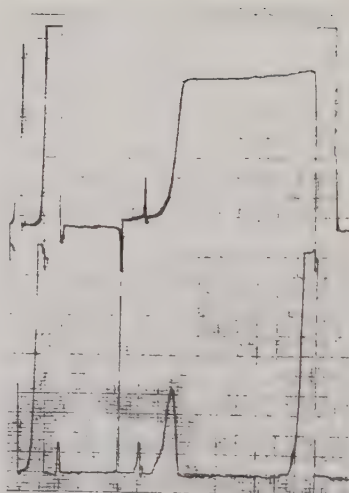


Abb. 11

2.4.2 Bestimmung von Molekulargewichten

Das Molgewicht der kleinsten, funktionellen Einheit des Spinnenhämocyanins wurde nach Yphantis (1960) ermittelt. Die 5 S-Einheit aus *Cupiennius salei* wurde durch alkalische Dissoziation der Hämolymphe und anschließende Chromatographie über Sephadex G 150 gewonnen. 6 S-Hämocyanin aus *Dugesia californica* erhielt man durch analoge Dissoziation von 37 S-Hämocyanin. Nach Prüfung der Probenhomogenität (Sedimentationslauf bei hohen Touren) erfolgten die Gleichgewichtsläufe. Unter Berücksichtigung des partiellen spezifischen Volumens ($V: 0,723$) und Einbeziehung der Korrekturfaktoren ergaben sich die folgenden Molekulargewichte:

Cupiennius salei:

70 300 Dalton
71 000 Dalton
69 600 Dalton

Dugesia californica:

72 000 Dalton
71 000 Dalton
69 000 Dalton

Cupiennius salei

69 000 Dalton

Dugesiella californica

69 300 Dalton

M: 69 900 Dalton

M: 70 300 Dalton

Damit lassen sich Molekulargewichtsmittel von 69 900 und 70 300 Dalton angeben. Da sich diese nur unwesentlich unterscheiden, müssen die unterschiedlichen Sedimentationskonstanten (5 bzw. 6 S) daher durch Unterschiede in der Tertiärstruktur der beiden Proteine begründet sein. Für das 16 S-Partikel errechnet sich bei 6 Untereinheiten ein Molgewicht von 420 000, für die 24 S- und 37 S-Partikel Molekulargewichte von 840 000 und 1 680 000 Dalton. Aus der Protein/Kupfer-Relation (vgl. 4) lassen sich nach der Gleichung $M = 2 \times 63,5 \times 100 / \% \text{ Cu}$ Molgewichte um 80 000 Dalton angeben. Dieser Wert ist infolge präparationsbedingten Kupferverlusten zu hoch, bestätigt aber die Größenordnung des Molekulargewichts.

In einem Fall wurde versucht das Molgewicht der 37 S-Einheit zu bestimmen; es ergab sich ein Wert um 1 700 000 Dalton. Da Gleichgewichtsläufe für Proteine dieser Größenordnung meist nicht mehr durchführbar sind, dürfte diese Ziffer eher ein Zufallsergebnis sein.

3. Elektrophoretisches Verhalten

Hochmolekulare Proteine (ab ca. 1×10^6 Dalton) können in 5-6 prozentige Polyacrylamidgele nur sehr erschwert einwandern. Infolge des stark wirksamen Molekularsiebeffekts machen sich daher Ladungsunterschiede nur geringfügig bemerkbar. Zur Untersuchung der Frage, ob die Hämocyane elektrophoretisch einheitlich sind oder aus Fraktionen unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit bestehen, war es daher notwendig, in einem Elektrophoresesystem zu arbeiten, in welchem Auftrennungen primär auf Grund von Ladungsunterschieden erfolgen.

Elektrophoresen von Hämolympheproteinen und durch Gel-filtration gereinigten Hämocyaninen wurden in einem Agarose-Acrylamidgelsystem (2,7-4 % Acrylamid) durchgeführt. 37 S-Hämocyanin aus Vogelspinnen sowie Begleitprotein ergaben jeweils nur eine Bande (Abb. 12).

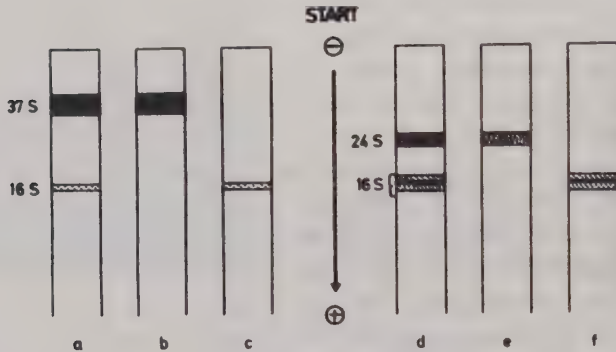


Abb. 12: Analytische Discelektrophorese im Agarose-Acrylamidgel, 3,5-proz. Gel, 200 V konst., 30 Min.

- | | |
|---------------------------|--------------------|
| a.) Hämolymphe aus Vogel- | d.) Hämolymphe aus |
| spinnen | Cupiennius |
| b.) 37 S-HCy | e.) 24 S-HCy |
| c.) 16 S-BP | f.) 16 S-HCy/BP |

Bei Verwendung älterer Proben trat unmittelbar im Anschluß an die 37 S-Bande noch eine weitere, deutlich schwächere auf. Diese Bande, welche auch bei Reassoziationsversuchen (vgl. 8.2) auftritt, wird vornehmlich in 4-proz. Gelen beobachtet; sie dürfte eher einer hochmolekularen Zwischenstufe (33 S bzw. 27 S) als einer zweiten Spezies von 37 S-Hämocyanin zuzuordnen sein. Elektrophorese von 24 S-Protein aus Cupiennius ergab eine, 16 S-Protein erwartungsgemäß zwei Banden (Abb. 12, d-f).

4. Cu-Gehalt, UV-Spektren und O₂-Bindung des Hämocyanins

Bestimmung von Kupfer im Spinnenhämocyanin ergab bei Vogelspinnen einen Wert von 0,157, bei Cupiennius salei 0,154 %. Unter der Annahme, daß die funktionelle Einheit zwei Cu-Atome besitzt, ergibt sich aus der Protein/Kupfer-Relation für die kleinste Untereinheit ein Molgewicht von ca. 80 000 Dalton. Dieser Wert liegt um 10 000 Dalton über dem Molekulargewicht, das durch Ultrazentrifugation ermittelt wurde, was auf einen partiellen Verlust von Kupfer zurückgehen dürfte.

Das Absorptionsspektrum zeigt für 37 S- und 24 S-Hämocyanin den für Hämocyanine typischen Verlauf mit Maxima bei 278 und 340 nm. Damit steht in Einklang, daß 37 S-, 24 S-, 16 S-, 6 S- und 5 S-Hämocyanine in der Lage sind Sauerstoff reversibel zu binden (vgl. 8.4).

5. Bestimmung der N-terminalen Aminosäure

In der Endgruppenbestimmung nach Edman (1950) verhielten sich Hämocyanine und Begleitproteine, aus Vogel- und Kammspinnen, gleich. Bei der Untersuchung der organischen Phase (3 Chromatographiesysteme) wurde im Dünnschichtchromatogramm nur ein deutlicher Fleck gefunden, welcher wie PTH-Isoleucin läuft (Abb. 13). Reaktion mit Ninhydrin (Collidin-gepuffert) führte jedoch nicht zu der typischen, blauvioletten Färbung, welche für PTH-Isoleucin charakteristisch ist; wahrscheinlich handelt es sich bei diesem Fleck um ein Nebenprodukt der Reaktion, Diphenylthioharnstoff. Dieser Fleck tritt nämlich auch beim Edman-Abbau von Rinderserumalbumin (Asparaginsäure als N-Terminus) auf.

Chromatographie der wässrigen Phase: Bei Vorversuchen mit den unfractionierten Hämolympheproteinen trat ein Fleck auf, welcher wie PTH-Arginin läuft und mit Ninhydrin positiv reagiert. Während PTH-Arginin bei der modifizierten Reaktion nach Sakaguchi (Acher, 1952) eine intensive Rotfärbung ergibt, zeigte obiger Fleck keine Farbreaktion. Mittels der für PTH-Arginin eben-

falls hochspezifischen Reaktion nach Itano (1963) konnte ein weiterer Beweis erbracht werden, daß es sich hierbei nicht um PTH-Arginin handelt, da die typische Fluoreszenz bei 366 nm fehlte. Bei Einsatz von gereinigtem Hämocyanin fehlt dieser Fleck. Zieht man die Ergebnisse aus den Chromatographien der organischen Phase dazu ist der Schluß erlaubt, daß die N-terminale Aminosäure von Hämocyanin und Begleitprotein, bei allen drei untersuchten Arten, blockiert ist.

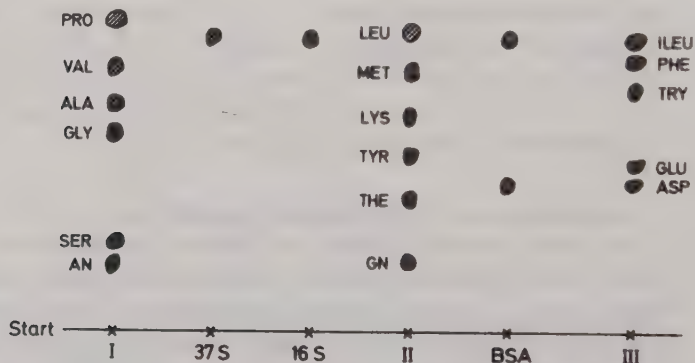


Abb. 13: Identifizierung der PTH-Aminosäuren (organische Phase) durch Dünnschichtchromatographie; unten: Auftragungsort; aufgetragene Proben von links nach rechts:

- 1.) Standard I: Asparagin, Serin, Glycin, Alanin, Valin, Prolin.
- 2.) 37 S-Hämocyanin
- 3.) 16 S-BP aus Vogelspinnen
- 4.) Standard II: Glutamin, Threonin, Tyrosin, Lysin, Methionin, Leucin.
- 5.) Rinderserumalbumin (BSA)
- 6.) Standard III: Asparaginsäure, Glutaminsäure, Tryptophan, Phenylalanin, Isoleucin.

6. Die Eigenschaften des Begleitproteins

Die Begleitproteine aus Vogel- und Kammspinnen zeigen weitgehende Übereinstimmung. Die Sedimentationskonstante von 16 S und die Blockierung der N-terminalen Aminosäure stellen die einzigen bis jetzt bekannten Gemeinsamkeiten zwischen Hämocyanin und Begleitprotein dar. Das UV-Spektrum dagegen weist bei 340 und 560 nm keine Maxima auf. Die Untersuchung des Begleitproteins auf Kupfer mittels Atomabsorptionsspektroskopie ergab, daß es kein Kupfer enthält. Dieses Protein ist daher auch nicht in der Lage Sauerstoff zu binden. Das Verhältnis Hämocyanin/Begleitprotein, bei den Vogelspinnen 82 : 18, bei Cupiennius 75 : 25 %, ist stets konstant. Trotzdem besteht kein funktioneller Zusammenhang zwischen Begleitprotein und Hämocyanin. Es konnte reproduzierbar und unabhängig von der Präparationsart gezeigt werden, daß Dissoziation von 37 S- und 24 S-Hämocyanin nur zu 16 S-Hämocyanin führt. Auch eine Assoziation von Begleitprotein wurde nie beobachtet. Hämocyanine sind durch ein typisches Dissoziations-Assoziationsverhalten ausgezeichnet; Begleitproteine zeigen aber weder pH- noch Temperaturabhängigkeit des Aggregationszustandes (vgl. 7). Elektronenmikroskopische Aufnahmen schließlich zeigen den strukturellen Unterschied: Die " tütenförmige " Quartärstruktur des Begleitproteins steht im Gegensatz zu den kubischen Aggregaten des Hämocyanins (vgl. 8.3). Dazu paßt auch, daß J. Markl (Dissertation, 1976) signifikante Unterschiede bei der quantitativen Aminosäureanalyse der beiden Proteine finden konnte.

7. Das Dissoziations-Assoziationsverhalten

37 S-Einheiten aus *Dugesiella californica* und 24 S-Komponenten aus *Cupiennius salei* zeigen eine Abhängigkeit des Aggregationszustandes von verschiedenen Parametern.

7.1 Einfluß von pH-Wert, Pufferspezies und Ionenstärke

Dugesiella:

37 S-Hämocyanin wurde bei einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml im pH-Bereich 6,2-9,65 bei 5 und 25 °C untersucht. Es wurde jeweils 48 Stunden gegen den angegebenen Puffer dialysiert, und die Proben anschließend bei 36 000 bzw. 40 000 UPM zentrifugiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 bzw. in den Abb. 16 bis 21 wiedergegeben.

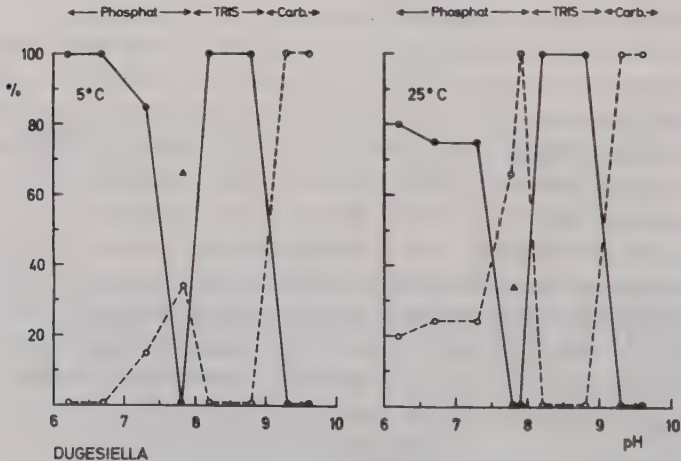


Abb. 14: Änderung des Dissoziations-Assoziationsgleichgewichts von 37 S-HCy aus *Dugesiella californica* mit dem pH-Wert, bei 5 und 25 °C; 37 S- (●), 27 S- (▲) und 6 S-Einheiten (○).

Der pH-Stabilitätsbereich von pH 8,2 - 9,0 wird von beiden Seiten durch Bereiche begrenzt, innerhalb derer eine Dissoziation von 37 S-Hämocyanin stattfindet. Oberhalb von pH 9 (alkalischer Dissoziationsbereich, vgl. 7.2) dissoziiert 37 S-Hämocyanin über hochmolekulare Zwischenstufen (33 S und 27 S) in der Regel in 6 S-Einheiten; die erwarteten 16 S- und 24 S-Komponenten wurden nicht beobachtet. Ab pH 9,3 ist die Dissoziation quantitativ. Im pH-Bereich 7,85 - 7,95 wird in Phosphatpuffer (I 0,1) bei 25 °C ebenfalls eine quantitative Zerlegung von 37 S-Hämocyanin beobachtet. Bei pH 7,8 liegen bei 5 °C neben 34 % 6 S-Einheiten noch 66 % 27 S-Partikel vor, bei 25 °C 66 % 6 S- und 34 % 27 S-Komponenten. Temperaturerhöhung von 5 auf 25 °C führt im Bereich pH 6,2 - 7,3 ebenfalls zu einem signifikant erhöhten 6 S-Anteil. Die Dissoziations-Assoziationsgleichgewichte zeigen auch eine Abhängigkeit von der Art der verwendeten Puffer und der Proteinkonzentration (Tabelle 2).

Tabelle 2: Zur Abhängigkeit des Dissoziations-Assoziationsgleichgewichts von 37 S-Hämocyanin von der Pufferspezies und der Proteinkonzentration.

pH	Prot. konz. (mg/ml)	Puffer	Temp. (°C)	6 S %	16 S %	27 S %	37 S %
7,8	0,5	Phosphat	5	34	--	66	--
7,85	1,5	Phosphat	5	47	--	53	--
7,85	6,0	Phosphat	5	16	26	--	58
7,5	0,5	Tris/HCl	5	10	--	--	90
7,5	6,0	Phosphat	5	--	--	--	100
7,85	0,5	Tris/HCl	5	20	--	--	80
7,85	1,5	Tris/HCl	5	--	--	--	100
7,92	1,5	Phosphat	25	100	--	--	--
9,3	0,5	Tris/HCl	5	44	--	--	56
9,3	0,5	Bicarbon.	5	100	--	--	--
9,65 ⁺	0,5	Tris/HCl	5	45	--	--	55
9,65	0,5	Bicarbon.	5	100	--	--	--
9,70 ⁺⁺	0,5	Tris/Borat	25	100	--	--	--

⁺ : I $\approx$ 0,1 ; ⁺⁺ : 0,13 M Tris ;

Tris/HCl-Puffer zeigt im Vergleich zu Phosphat- bzw. Bicarbonatpuffer bei gleichem pH-Wert, eine stark stabilisierende Wirkung. Die stabilisierende Wirkung des Tris-Puffers wird besonders deutlich durch Versuche zur Dissoziation von 37 S-Hämocyanin bei niedrigen Proteinkonzentrationen demonstriert. Bei pH 7,5 und 1 mM Mg^{++} erfolgt im Konzentrationsbereich von 2,4 bis herab zu 0,04 mg/ml überhaupt keine Dissoziation (Tabelle 3).

Tabelle 3: Untersuchungen zur konzentrationsabhängigen Dissoziation von 37 S-Hämocyanin in Tris/HCl-Puffer pH 7,5, 1 mM Mg^{++} .

Proteinkonz. :	2,4	1,6	0,8	0,4	0,08	0,04
(mg/ml)						
S_{app}	: 34,5	35,1	36,7	35,9	35,2	34,6

In Tris/Borat-Puffer pH 9,7 (0,13 M Tris) hingegen ist durch zweitägige Dialyse bei 25 °C eine quantitative Zerlegung von 37 S- in 6 S-Hämocyanin möglich. Erhöhung der Proteinkonzentration verschiebt das Gleichgewicht zu Gunsten der hochmolekularen Einheiten.

Die Dissoziation im pH-Bereich 7,8 - 7,95 ist von besonderem Interesse, da dieser Bereich an den physiologischen pH der Hämolymphe (in vitro an zentrifugierter Hämolymphe pH 7,9 - 8,15) angrenzt. Wird zentrifugierte Hämolymphe mit 0,1 N HCl auf pH 7,8 - 7,9 eingestellt, so tritt über Nacht eine Dissoziation ein (48 % 37 S-, 37 % 16 S- und 15 % 6 S-Einheiten) welche mit einer Gelbfärbung der Hämolymphe verknüpft ist. Dieser Vorgang wurde sowohl in Zellen, welche für Sedimentationsläufe verwendet werden, als auch in verschließbaren Küvetten beobachtet.

Um zu prüfen, ob eine vollständige Entfernung von Ca^{++} und Mg^{++} eine Veränderung des Aggregationszustandes des Hämocyanins bewirkt, wurden 37 S-Partikel (Proteinkonzentration 0,5 mg/ml) zwei Tage gegen Tris/HCl-Puffer pH 8,0, enthaltend 30 mM EDTA, dialysiert. Bei der anschließend durchgeführten

Sedimentationsanalyse wurde nur 37 S-Hämocyanin gefunden, d.h. Komplexbildnerzugabe im pH-Stabilitätsbereich führt zu keiner Dissoziation.

Der Einfluß der Ionenstärke wurde bei drei pH-Werten untersucht. In Phosphatpuffer der Ionenstärke 0,1 bzw. 0,02 zeigt sich bei pH 7 (25 °C) kein signifikanter Unterschied im 6 S-Anteil. Eine Erhöhung der Ionenstärke von 0,1 auf 1,1 (1 M NaCl) führte sowohl bei pH 7 (Phosphatpuffer) als auch bei pH 9,65 (Bicarbonatpuffer, Beobachtungszeitraum 84 Minuten) zu einer Unterdrückung der Dissoziation (vgl. 7.2). Wird 37 S-Hämocyanin zwei Tage gegen einmolare Kochsalzlösung (I 1,0) pH 5,4 dialysiert so erfolgt ebenfalls keine Dissoziation.

Cupiennius:

Das Dissoziations-Assoziationsverhalten des 24 S-Hämocyanins aus Cupiennius (Proteinkonzentration 0,5 mg/ml) wurde ebenfalls im pH-Bereich 6,2 - 9,65 analysiert (Abb. 15).

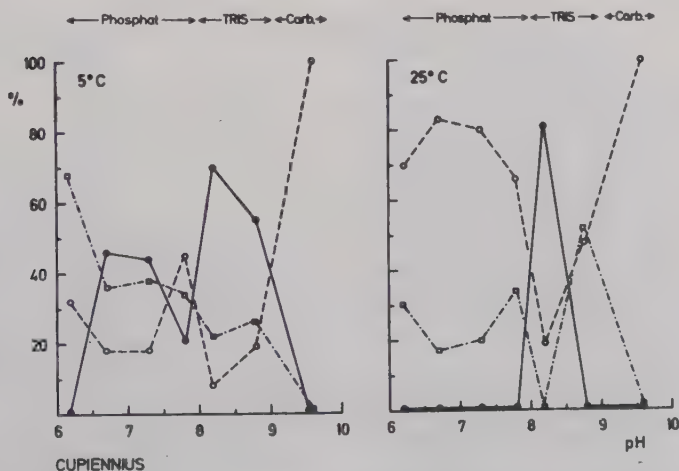


Abb. 15: Änderung des Dissoziations-Assoziationsgleichgewichts von 24 S-Hämocyanin mit dem pH-Wert, bei 5 und 25 °C; 24 S- (●), 16 S- (□) und 5 S-Einheiten (○).

Der Anteil der 24 S-Komponente, bei pH 6,2 (saurer Dissoziationsbereich) noch Null, steigt bei pH 6,7 auf 46 % um bei pH 7,8 (" physiologischer Dissoziationsbereich ") wieder auf ein Minimum von 21 % abzusinken (Abb. 15). Bei pH 8,2, bei 5 °C, liegt ein zweites Maximum des 24 S-Hämocyans; dies ist auch der einzige pH-Wert, bei welchem auch bei 25 °C noch 24 S-Einheiten vorliegen. Im alkalischen Dissoziationsbereich (pH 9,6) erfolgt bei 5 bzw. 25 °C die quantitative Zerlegung der 24 S- in 5 S-Komponenten. Temperaturerhöhung führt im übrigen im gesamten pH-Bereich zu einem erhöhten Anteil an niedermolekularen (16 S- bzw. 5 S) Untereinheiten. Die nach jeweils zweitägiger Dialyse eingetretenen Verhältnisse werden in den Abb. 22 mit 27 in einer Reihe von Beispielen dokumentiert.

Abb. 16: 37 S-HCy, 48 h/5 °C bei pH 7,2. UV-Scanner, nach 32 Min. , 36 000 UPM, 25 °C.

Abb. 17: Bedingungen analog Abb. 16, jedoch bei pH 7,8.

Abb. 18: 37 S-HCy, 48 h/5 °C bei pH 9,6. UV-Scanner, nach 40 Min. , 40 000 UPM, 25 °C.

Abb. 19: 37 S-HCy, 48 h bei 25 °C, pH 6,2. UV-Scanner, nach 24 Min., 36 000 UPM, 25 °C.

Abb. 20: Bedingungen analog Abb. 19, jedoch bei pH 6,7.

Abb. 21: 37 S-HCy, 48 h/ 25 °C, bei pH 7,92. UV-Scanner, nach 24 Min., 40 000 UPM, 25 °C.

Abb. 22: 24 S-HCy, 48 h/5 °C bei pH 6,2. UV-Scanner, nach 24 Min. , 40 000 UPM, 25 °C.

Abb. 23: Bedingungen analog Abb. 22, jedoch bei pH 6,7.

Abb. 24: 24 S-HCy, 48 h/5 °C bei pH 7,2. UV-Scanner, nach 40 Min. , 40 000 UPM, 25 °C.

Abb. 25: Bedingungen analog Abb. 24, jedoch bei pH 7,8.

Abb. 26: 24 S-HCy, 48 h/5 °C bei pH 8,2. UV-Scanner, nach 40 Min. , 40 000 UPM, 25 °C.

Abb. 27: Bedingungen analog Abb. 26, jedoch bei pH 9,6.

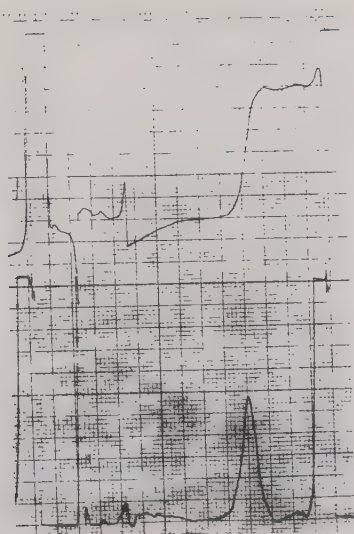


Abb. 16

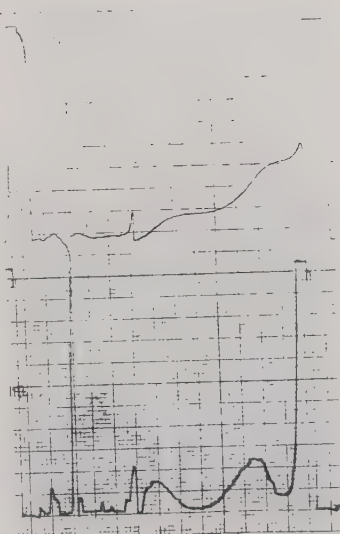


Abb. 17

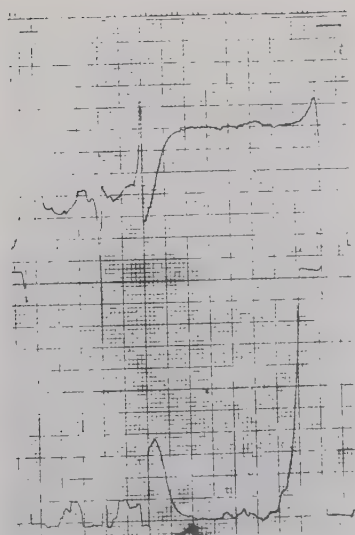


Abb. 18

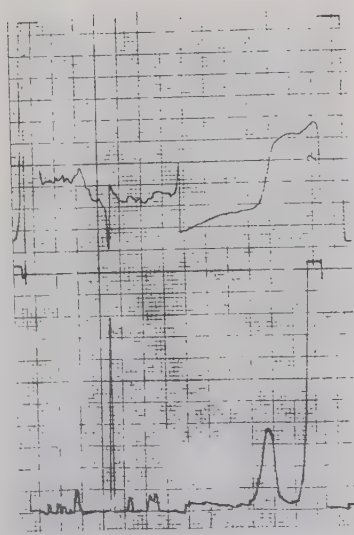


Abb. 19

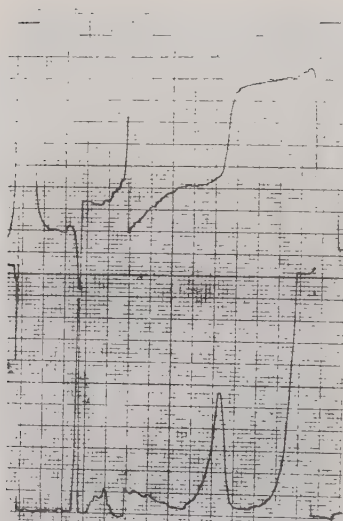


Abb. 20

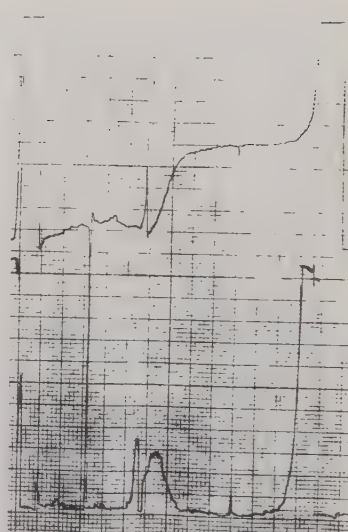


Abb. 21

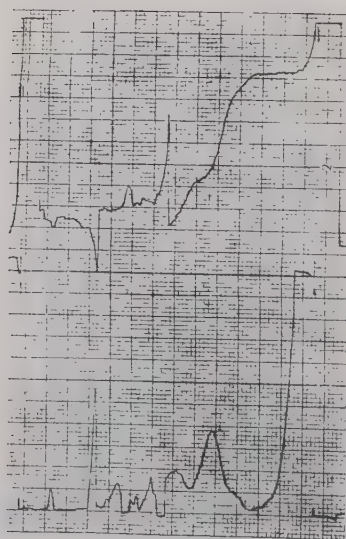


Abb. 22

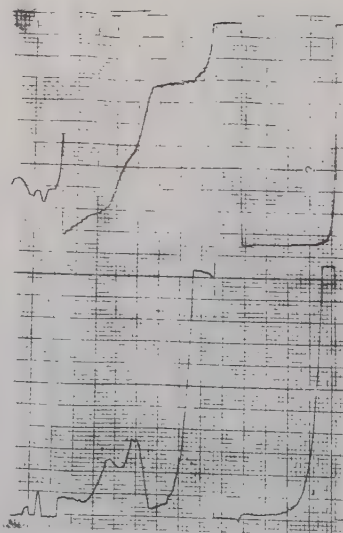


Abb. 23



Abb. 24

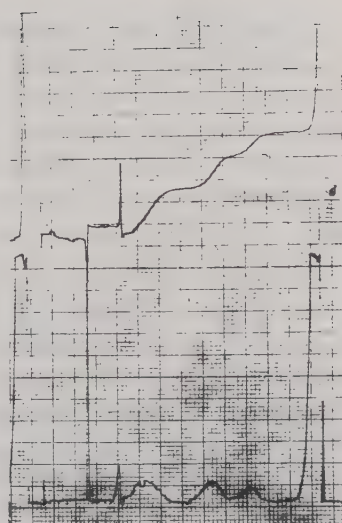


Abb. 25

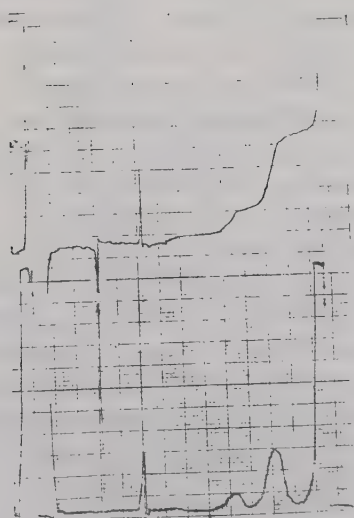


Abb. 26

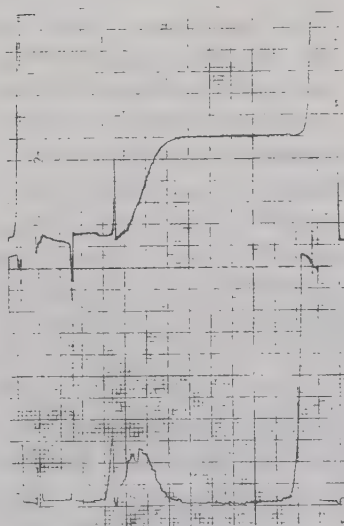


Abb. 27

7.2 Die Dissoziation des Hämocyansins

Im vorhergehenden Abschnitt wurden Änderungen der Dissoziations-Assoziationsgleichgewichte analysiert, wie sie sich nach Tagen eingestellt hatten. Im alkalischen Dissoziationsbereich ist das Gleichgewicht ganz zu Gunsten der kleinsten, funktionellen Einheit verschoben. Im folgenden sollen Versuche geschildert werden, durch welche der Ablauf der Dissoziation zeitlich erfaßt werden sollte.

Um die Kinetik der Dissoziation ab einem möglichst frühen Zeitpunkt nach Milieuwechsel verfolgen zu können, wurde 37 S-Hämocyanin (pH 7,5) in einer " Vinograd-Zelle " (Vinograd, 1963) in Bicarbonat-Dissoziationspuffer (pH 9,6), enthaltend 1 M NaCl, hineinzentrifugiert. Innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 84 Minuten fand jedoch keine Dissoziation statt, was auf die hohe Ionenstärke der Gradientenlösung (I 1,1) zurückgehen dürfte. Wird 1 M NaCl durch 10-prozentige Saccharose ersetzt, zeigt sich das gleiche, negative Ergebnis. Aus diesem Grund konnte der Dissoziationsvorgang erst ab 80 Minuten nach Pufferwechsel verfolgt werden (der Pufferwechsel erfolgte jetzt durch Konzentrieren der Proteinelösung mittels Membranfiltration und Aufnehmen im gewünschten Puffer; verwendet wurden " Minicon " -Elemente der Firma Amicon). Wie schnell die Dissoziation einsetzt, wird durch folgende Versuche gezeigt: Wird der pH-Wert von Bicarbonatpuffer (I 0,1) über 9 gehoben, so beginnt innerhalb eines Zeitraumes von 84 Minuten die deutliche Dissoziation des 37 S-Hämocyansins. Der 6 S-Anteil steigt innerhalb von 0,5 pH-Einheiten (pH 9,1 - 9,6) signifikant an. Erhöhung der Proteinkonzentration führt andererseits bereits im Bereich von 0,2 bis 0,8 mg/ml zu einer Verringerung des Anteils an 6 S-Molekülen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Abhängigkeit der Bildung von 6 S-Hämocyanin aus 37 S-HCy vom pH-Wert und der Proteinkonzentration, 84 Min. nach Milieuwechsel. Die Ausgangslösung hatte pH 7,5.

pH	Proteinkonzentration		
	0,2 mg/ml	0,4 mg/ml	0,8 mg/ml
9,10	--	--	17 %
9,25	--	26 %	23 %
9,65	69 %	65 %	55 %

Die quantitative Dissoziation von 37 S-Hämocyanin erfordert allerdings, je nach Proteinkonzentration, einen Zeitraum von ca. zwei Tagen (Abb. 28).

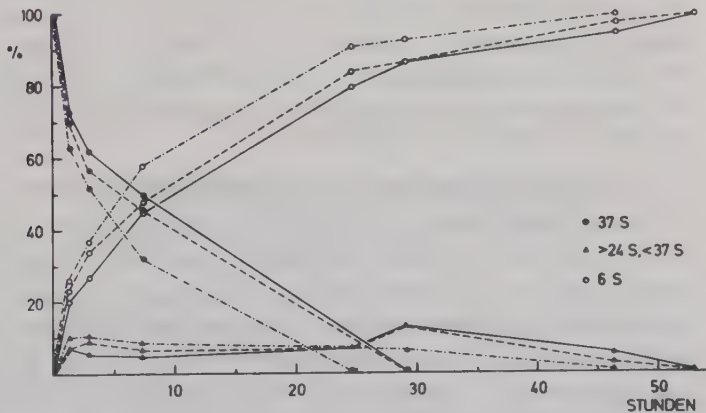


Abb. 28: Kinetik der Dissoziation von 37 S-Hämocyanin (*Dugesia*) in Bicarbonatpuffer pH 9,25 (I 0,1) bei Raumtemperatur. 37 S- (●), hochmol. Zwischenstufen (▲), 6 S-Einheiten (○); Proteinkonzentration: — 1,6 mg/ml

--- 0,8 mg/ml

... 0,4 mg/ml

Für die im folgenden Abschnitt (7.3) dargestellten Versuche zur Rekonstitution von 37 S- aus 6 S-Einheiten und deren Funktionsfähigkeit (O_2 -Bindung) mußte untersucht werden, ob bei alkalischer Dissoziation Kupfer abgespalten wird. Die quantitative Kupferbestimmung durch Atomabsorptionsspektroskopie zeigt, daß in Bicarbonatpuffer pH 9,6 kein Kupfer abgespalten wird. Bei Zugabe von 10 mM EDTA zum Dissoziationspuffer wurden jedoch bis zu 50 % Kupfer abgespalten. Aus diesem Grund wurde immer ohne Zugabe von Komplexbildnern dissoziiert.

7.3 Reassoziationsversuche

Durch Aggregation von 5 S- bzw. 6 S-Einheiten entstehen über 16 S-Komponenten ("physiologisches Monomer") und hochmolekulare Zwischenstufen ("Z" bzw. 33 S- und 27 S-HCy) 24 S- (Dimer) und 37 S-Partikel.

Werden 37 S-Einheiten mittels verschiedener Puffer (Tris/Borat- bzw. Bicarbonatpuffer) dissoziiert, führen anschließend durchgeführte Reassoziationsversuche jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen.

7.3.1 Reassoziatiön nach Tris/Borat-Dissoziation

In einer ersten Serie von Experimenten wurde 37 S-Hämocyanin aus *Dugesia* mit Tris/Boratpuffer von pH 9,7 quantitativ dissoziiert. Bei zweitägiger Dialyse gegen Tris/HCl-Puffer vom pH 7,5 (aber ohne Zusatz zweiwertiger Kationen) wird bereits eine partielle Reassoziatiön beobachtet. Wird die Reassoziatiön in Gegenwart von Mg^{++} über den Zeitraum von einer Woche durchgeführt, so zeigt sich eine inverse Abhängigkeit von der Mg^{++} -Konzentration: Bei 1 mM Mg^{++} findet man ausschließlich 37 S-Partikel, bei 10 oder 100 mM Mg^{++} sinkt der Anteil der 37 S-Komponente auf 65 und 55 % (Tabelle 4). 1 mM ist offensichtlich die optimale Mg^{++} -Konzentration zur Reassoziatiön; sie entspricht der Konzentration in vivo.

Tabelle 4: Abhängigkeit der Reassoziation von 6 S₂ zu 37 S-Einheiten von der Zeit und der Mg⁺⁺-Konzentration; Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, Proteinkonzentration 0,5 mg/ml, 25 °C; Zahlenangaben: % an 37 S-Partikeln.

Tage	mM Mg ⁺⁺	0	1	10	100 ⁺
2		43 %	56 %	59 %	53 %
7		---	100 %	65 %	55 %
9		---	100 %	70 %	58 %

⁺: Bei Verwendung von 100 mM Mg⁺⁺ kommt es zur Bildung von nicht definierten, hochmolekularen Aggregaten.

7.3.2 Reassoziation nach Bicarbonatdissoziation

37 S-Hämocyanin wurde durch zweitägige Dialyse gegen Bicarbonatpuffer, pH 9,6, quantitativ dissoziiert. Anschließend wurden nun Proben einer Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml unter verschiedenen Bedingungen, während 11 Tagen, bei 25 °C reassoziiert (Tabelle 5).

Tabelle 5: Reassoziation von 6 S-Hämocyanin zu 16 S- und 37 S-Partikeln nach Dissoziation in Bicarbonatpuffer; Proteinkonzentration 0,5 mg/ml, 11 Tage bei 25 °C.

pH	Puffer	Mg ⁺⁺	Ca ⁺⁺	6 S	16 S	37 S
7,5	Veronal	---	---	100 %	---	---
7,5	Tris/Hcl	---	---	66 %	---	34 %
7,5	Tris/HCl	1 mM	---	16 %	12 %	72 %
7,5	Tris/HCl	---	40 mM	---	35 %	65 %

Es zeigt sich, daß der Anteil an 37 S-Einheiten, die nach Bicarbonat-Dissoziation aus dem entstandenen 6 S-Material reassoziert werden, signifikant geringer ist als nach Dissoziation in Tris/Borat-Puffer. Abb. 29 zeigt die Verteilung von 6 S-, 16 S- und 37 S-Einheiten in Gegenwart von 1 mM Mg^{++} .

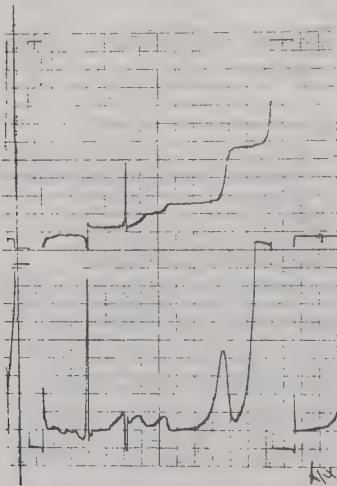


Abb. 29: Partielle Reassozi-
ziation von 6 S-Hcy
nach 11 Tagen/25 °C
in Tris/HCl-Puffer,
pH 7,5, in Gegenwart
von 1 mM Mg^{++} . UV-
Scan, nach 32 Min.,
36 000 UPM, 25 °C.
Komponenten von links
nach rechts: 6 S-,
16 S- und 37 S-Partikel.

Während allein mit Tris/HCl-Puffer, pH 7,5, ohne Zusatz zweiwertiger Kationen, eine Reassoziaton bis zu 34 % an 37 S-Einheiten erfolgt, kommt es in Veronalpuffer unter gleichen Bedingungen zu keiner Reassoziaton. Dies zeigt, daß neben dem pH-Wert auch die Pufferspezies entscheidend ist. Hohe Konzentrationen an Ca^{++} bewirken einen erhöhten Anteil an 16 S-Partikeln.

Die Reassoziationskinetiken zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der Konzentration zweiwertiger Kationen (Abb. 30). Reassoziaton in Gegenwart von 1 mM Mg^{++} führt zu einer etwas höheren Reassoziationsrate von 37 S-Einheiten (60 %), als in Gegenwart von 4 mM Ca^{++} (55 %). Eine Kombination von 1 mM Mg^{++} /4 mM Ca^{++} bringt keine Erhöhung. In Gegenwart

von 40 mM Ca^{++} beträgt der Anteil an 37 S-Partikeln nach 26 Stunden bereits 38 %; er ändert sich aber während des weiteren Zeitverlaufs nur noch unwesentlich (+ 5 %).

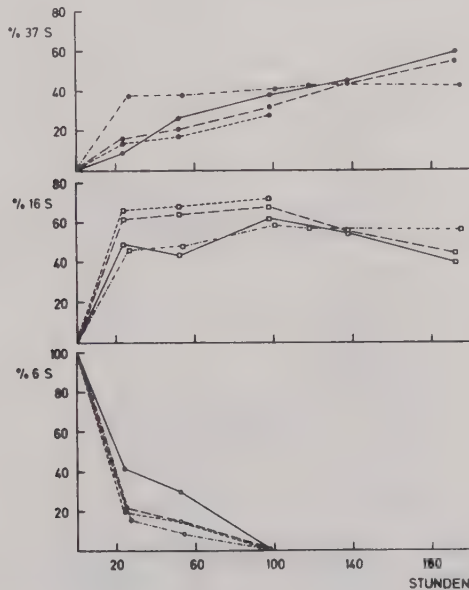


Abb. 30: Reassoziationskinetik von 6 S-Hcy in Abhängigkeit von der Mg^{++} - und Ca^{++} -Konzentration; Proteinkonzentration 0,25 mg/ml, Temperatur 25 °C. 37 S- (●), 16 S- (□) und 6 S-Partikel (○).
 — 1 mM Mg^{++} , — 4 mM Ca^{++}
 ---- 1 mM Mg^{++} /4 mM Ca^{++} , -.-.-. 40 mM Ca^{++} .

Auch bei *Cupiennius salei* - Hämocyanin zeigt sich eine Abhängigkeit der Reassoziationskinetik von der Konzentration zweiwertiger Kationen. Hohe Konzentrationen von Mg^{++} (100 mM) bewirken, daß nach 198 Stunden neben 75 % 6 S-Einheiten 25 % undefinierte Aggregate vorliegen; es kommt zu keiner Bildung von 16 S-Hämocyanin (Abb. 31). Kombination von 1 mM Mg^{++} mit 4 mM Ca^{++} (die in vivo vorliegenden Konzentrationen) bewirkt eine etwas geringere

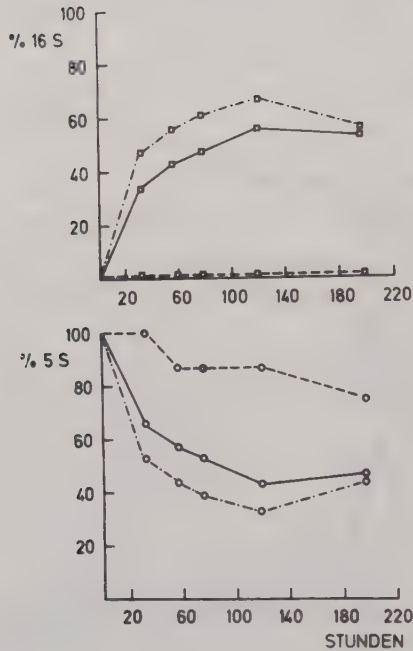


Abb. 31: Reassoziation von 5 S-Hämocyanin in Abhängigkeit von der Mg⁺⁺- und Ca⁺⁺-Konzentration; Proteinkonzentration 0,25 mg/ml, Temperatur 25 °C. 16 S- (□) und 5 S-Einheiten (○). — 1 mM Mg⁺⁺ / 4 mM Ca⁺⁺, ---- 100 mM Mg⁺⁺, -.-.- 40 mM Ca⁺⁺.

Reassoziationsrate von 16 S-Partikel als die Verwendung von 40 mM Ca⁺⁺.

In keinem Fall wurde eine Reassoziation zur 24 S-Einheit beobachtet; auch nach 3-tägiger Dialyse gegen Tris/HCl-Puffer (I 0,1) pH 8,2, enthaltend 40 mM Ca⁺⁺, wurde kein 24 S-Hämocyanin erhalten.

Durch Erhöhung der Proteinkonzentration auf ca. 4 mg/ml wurde nach 6-tägiger Dialyse gegen Tris/HCl-Puffer pH 7,5

40 mM Ca^{++} , 25 °C, auch die 24 S-Einheit erhalten (vgl. 8.3 bzw. 8.4). In diesem Fall wurde 5 S-Hämocyanin verwendet, welches durch Dissoziation aus 24 S-Hämocyanin gewonnen worden war. Eine analoge Reassoziations mit 5 S-Einheiten aus 16 S-Partikel führte nur bis zur 16 S-Komponente. Die Proteinkonzentration betrug in diesem Fall allerdings nur 1 mg/ml, sodaß nicht eindeutig geklärt ist, ob sich 16 S- und 24 S-Hämocyanin unterschiedlich oder prinzipiell gleich verhalten.

Die Reassoziations zeigt auch bei Dugesiella-Hämocyanin eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (Abb. 32).

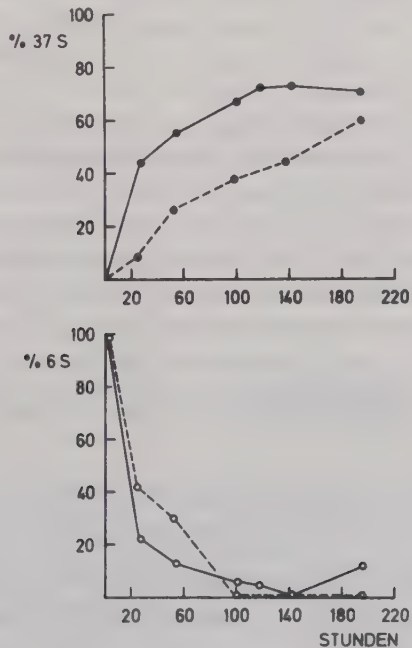


Abb. 32: Reassoziationskinetik in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration bei 25 °C. 37 S- (●) und 6 S-Einheiten (○). Proteinkonzentration: — 1,25 mg/ml, ---- 0,25 mg/ml.

Eine fünffache Erhöhung der Proteinkonzentration bringt nach 23 Stunden eine deutliche Steigerung im 37 S-Anteil (36 %), welche auch mit zunehmender Reassoziationszeit signifikant bleibt. Damit in Einklang steht die unterschiedliche Konzentrationsabnahme der 6 S-Partikel: nach 23 Stunden liegen bei einer Proteinkonzentration von 0,25 mg/ml noch 42 %, bei 1,25 mg/ml hingegen nur noch 22 % vor. Der Konzentrationsverlauf der 16 S-Einheiten war durch einen steilen Anstieg innerhalb der ersten 23 Stunden gekennzeichnet um dann mehr oder weniger oszillierend auf einen Endwert von 40 % (0,25 mg/ml) bzw. 10 % (1,25 mg/ml) abzusinken. Die bei der Reassoziations in geringen Mengen auftretenden hochmolekularen Zwischenstufen (33 S und 27 S) wurden bei den Darstellungen nicht berücksichtigt. Eine zusätzliche, 3-tägige Inkubation bei 37 °C brachte keine wesentlichen Veränderungen. Nach einem Zeitraum von ca. 5 Wochen war die Probe mit der Proteinkonzentration 1,25 mg/ml jedoch quantitativ zu 37 S-Hämocyanin reassoziert. Eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentration auf ca. 5 mg/ml führte bei einer Reassoziationsdauer von 20 Tagen bei 25 °C, je nach Bedingung, zu quantitativer bzw. nahezu vollständiger Reassoziations (Tabelle 5).

Tabelle 5: Reassoziations von 6 S-Hämocyanin zu 37 S-Partikeln, 20 Tage bei 25 °C, Proteinkonzentration ca. 5 mg/ml.

Kat ⁺⁺	37 S	16 S	6 S
1 mM Mg ⁺⁺	100 %	--	--
40 mM Ca ⁺⁺	85 %	15 %	--
ohne	90 %	--	10 %

Die Assoziation erfolgt in jedem Fall so langsam, daß die verschieden hoch aggregierten Komponenten durch Chromatographie über Biogel A 5m getrennt werden können (Abb. 33).

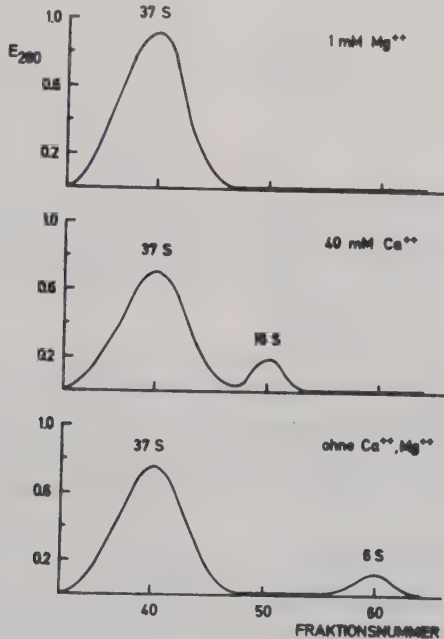


Abb. 33: Extinktionsverlauf in den Fraktionen nach Chromatographie der Reassoziante aus 6 S-Hcy über Biogel A 5m; Proteinkonzentration ca. 5 mg/ml, 20 Tage bei 25 °C, in Gegenwart von 1 mM Mg⁺⁺, 40 mM Ca⁺⁺ bzw. in Abwesenheit zweiwertiger Kationen.

Durch Variation der Proteinkonzentration und der Konzentration zweiwertiger Kationen, sowie durch Wahl eines geeigneten Zeitpunktes für Analyse bzw. weiterführende Versuche läßt sich also ein Gemisch verschieden hoch assoziierter Hämocyaninmoleküle erhalten, in welchem die

einzelnen Komponenten im gewünschten Verhältnis vertreten sind. Dies war vor allem von Vorteil, um den direkten Einfluß der Quartärstruktur auf die Sauerstoffbindung untersuchen zu können: 6 S-Hämocyanin einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml wurde 10 Tage gegen Tris/HCl-Puffer pH 7,5, 1 mM Mg^{++} , dialysiert; 37 S-, 16 S- und 6 S-Komponenten liegen dann im Gemisch vor und werden nach Chromatographie über Biogel A 5m rein erhalten (vgl. 8.4).

8. Struktureller und funktioneller Vergleich zwischen nativen und reassozierten Hämocyaninen

8.1 Sedimentationsanalyse

Die Sedimentationskoeffizienten von nativen und reassozierten 37 S-, 24 S- und 16 S-Einheiten zeigen völlige Übereinstimmung (S_{app} : Dugesiella 36,7 S, 16,2 S; Cupiennius 23,6 S, 16,0 S). Dieser Sachverhalt wird durch die Abbildungen 34 - 36 (Seite 49) veranschaulicht.

8.2 Elektrophoretisches Verhalten

Das elektrophoretische Verhalten von nativen und reassozierten 37 S-Hämocyaninen stellt einen weiteren starken Hinweis für die strukturelle Ähnlichkeit dar (Abb. 37). In Agarose-Polyacrylamidgelen wandern die 37 S-Partikel, ob sie nativ isoliert waren oder aus einem Reassoziat stammten, gleich schnell. Weiterhin wird veranschaulicht, daß die Reassoziat über 16 S- und hochmolekulare Zwischenstufen erfolgt. Im Reassoziat wurde eine geringfügig schnellere, schmalere Bande beobachtet, welche dem in der Ultrazentrifuge beobachteten Material mit 27-33 S entspricht, sowie eine 16 S-Bande, welche aber nicht mit der 16 S-Bande der nativen Hämolympheproteine zu vergleichen ist, sondern in Analogie zu Cupiennius-16 S-Hämocyanin eine vom Begleitprotein unterschiedliche, elektrophoretische

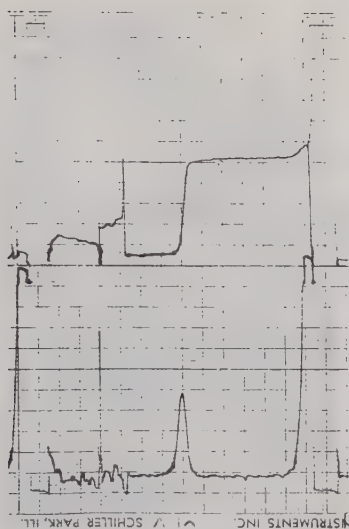


Abb. 34:
37 S-HCy reass., Tris/
HCl-Puffer pH 7,5, 1 mM
Mg⁺⁺, UV-Scanner, nach
16 Min., 40 000 UPM,
20 °C.

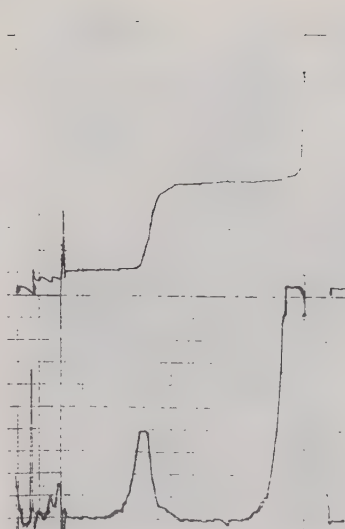


Abb. 35:
24 S-HCy reass., Tris/HCl-
Puffer pH 7,5, 40 mM Ca⁺⁺,
UV-Scanner, nach 32 Min.,
40 000 UPM, 20 °C.

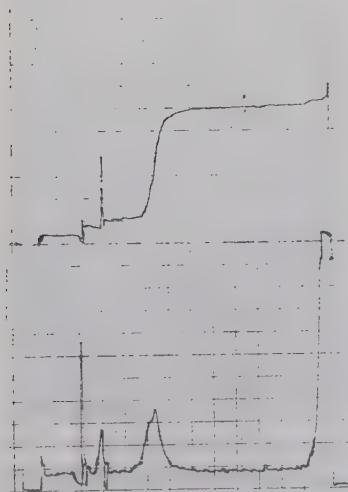


Abb. 36:
Cupiennius 16 S-HCy reass.,
Tris/HCl-Puffer pH 7,5, 40
mM Ca⁺⁺; UV-Scanner, nach
24 Min., 20 °C.

Beweglichkeit zeigt (Abb. 37).

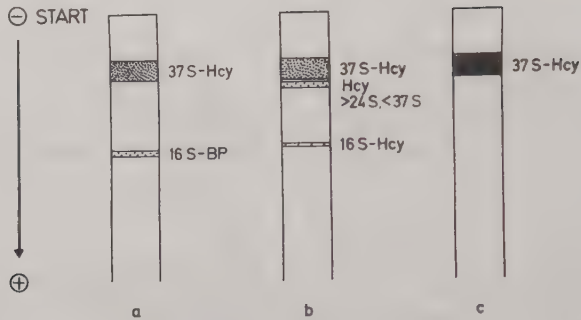


Abb. 37: Analytische Discelektrophorese von Reassoziationsprodukten aus 6 S-Hcy aus Dugesia im Agarose-Acrylamidgel-System; Gel 3,5-proz., 200 V konst., 30 Minuten.

a.) Dugesiella-Hämolymph

b.) nach partieller Reassoziierung von 6 S-Hcy

c.) nach quantitativer Reassoziierung von 6 S-Hcy

8.3 Die Quartärstruktur im elektronenmikroskopischen Bild

Ein Vergleich der Quartärstrukturen von nativen und reassozierten 37 S-, 24 S- und 16 S-Einheiten mittels Elektronenmikroskopie, zeigt ebenfalls keine Unterschiede (Abb. 38 mit 41). Weiterhin wird veranschaulicht, daß die Reassoziierung von 5 S- bzw. 6 S-Einheiten über 16 S-Partikel (Monomer) zu Dimeren (24 S-Hcy) bzw. tetrameren Strukturen (37 S-Hcy) führt (Abb. 39, 41).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von 5 S- bzw. 6 S-Hämocyanin stellen neben den Sedimentationsanalysen einen weiteren Beweis für die quantitative Dissoziation des Hämocyanins, mittels Bicarbonatpuffer pH 9,6, dar (Abb. 42).

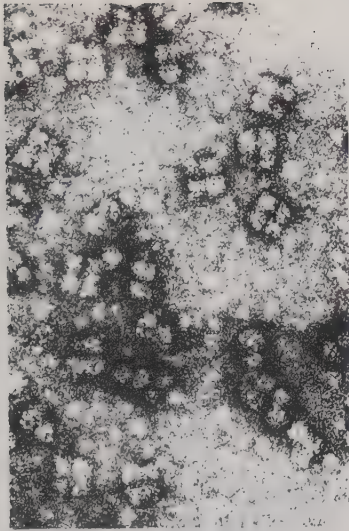


Abb. 38: Elektronenmikroskopie von 37 S nativ (Dugesia), pH 7,5, 1 mM Mg^{++} ; Vergrößerung 60 000 x 6.

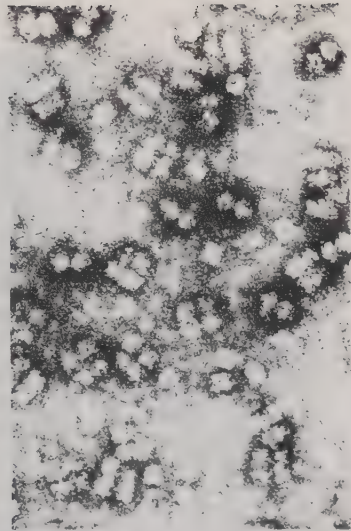


Abb. 39: Elektronenmikroskopie von 37 S- und 16 S-Einheiten, reass. aus 6 S-HCY (Dugesia), pH 7,5, 1 mM Mg^{++} ; Vergröß. 60 000 x 6.

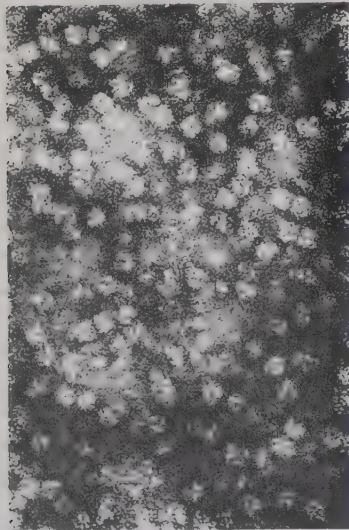


Abb. 40: Elektronenmikroskopie von nativen 24 S- und 16 S-Einheiten (Cupiennius), pH 7,5, 40 mM Ca^{++} ; Vergröß. 60 000x6.

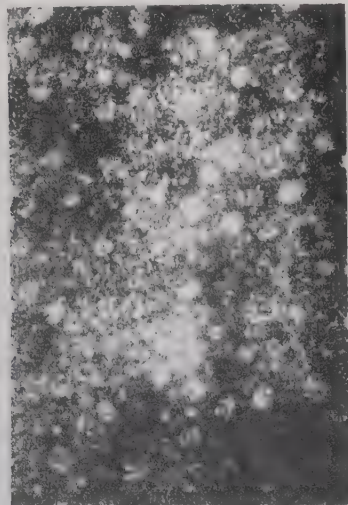


Abb. 41: Elektronenmikroskopie von 24 S- und 16 S-Einheiten (Cupiennius), reass. aus 5 S-HCY, pH 7,5, 40 mM Ca^{++} , Vergrößerung 60 000 x 6.

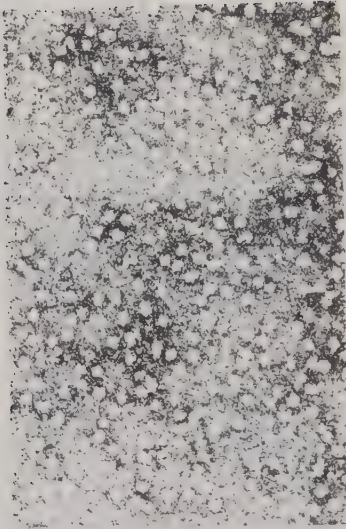


Abb. 42: Elektronenmikroskopie von 5 S-HCy (Cupiennius), pH 9,6 (Bicarbonatpuffer); Vergrößerung 60 000 x 6.

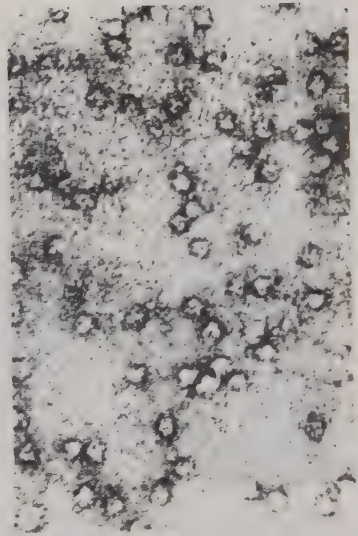


Abb. 43: Elektronenmikroskopie von 16 S-BP (Dugesia), pH 7,5, 1 mM Mg^{++} , Vergrößerung 19 000 x 13.

Ein Vergleich von Abb. 43 mit Abb. 38 bzw. 40 stellt die "tütenförmige Quartärstruktur" des Begleitproteins in deutlichen Gegensatz zu den kubischen Aggregaten des Hämocyanins.

8.4 Die Sauerstoffbindung

Sedimentationsanalysen, Untersuchungen zum elektrophoretischen Verhalten und elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen eine völlige Übereinstimmung zwischen nativen und reassozierten Einheiten. Es war als nächstes zu prüfen, ob in gleicher Weise wie die nativen 37 S-, 24 S- und 16 S-Partikel auch die reassozierten Hämocyanin-Partikel in der Lage sind, Sauerstoff reversibel zu binden. Dies wurde

(in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Loewe) mit Hilfe der von Loewe und Linzen (1975) entwickelten Methode zur Aufnahme von Sauerstoffbindungskurven untersucht (Tabelle 6, 7).

Tabelle 6: Vergleich der O_2 -Affinitäten von nativem und reassoziertem 37 S-Hämocyanin (*Dugesia*); Reassoziationsdauer 20 Tage bei 25 °C, Tris/HCl-Puffer, pH 7,5.

Einheit	Kat ⁺⁺ (mM)	Temp. (°C)	P ₅₀ (mm Hg)
37 S nat.	1 Mg ⁺⁺	20	15,6
37 S reass.	1 Mg ⁺⁺	25	14,5
37 S reass.	40 Ca ⁺⁺	25	10,4
37 S reass.	ohne	20	17,0

Bei der Aufnahme der Sauerstoffbindungskurven war das Ionenmilieu mit dem der Reassoziationsdauer identisch; daher waren in Folge der unterschiedlichen Konzentrationen an divalenten Kationen, unterschiedliche O_2 -Affinitäten zu erwarten (vgl. Loewe und Linzen, 1975). Interessanterweise liegen die P₅₀-Werte von reassozierten 37 S-Einheiten, in Gegenwart von 1 mM Mg⁺⁺ bzw. in Abwesenheit zweiwertiger Kationen, in der Größenordnung des Wertes welcher für natives 37 S-Hämocyanin erhalten wurde. Hohe Ca⁺⁺-Konzentrationen (40 mM) bewirken eine signifikant erhöhte Affinität. Die P₅₀-Werte dieser ersten Versuchsserie liegen allgemein niedriger als diejenigen der Folgeversuche. Diese Diskrepanz könnte in der Tatsache, daß die Reassoziationsdauer in der ersten Versuchsserie nahezu doppelt so lang war wie in der folgenden, begründet sein. Hämocyanine unterliegen bei Aufbewahrung einem

Alterungsprozeß (De Ley und Lontie, 1970).

Ein Vergleich der O_2 -Affinitäten und Hillkoeffizienten als Maß für die Kooperativität zwischen nativen und reassozierten Komponenten ermöglichte auch eine Beurteilung des Einflusses, den der Grad der Assoziation auf die Sauerstoffbindung hat. Dazu wurde 6 S-Hämocyanin einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml 10 Tage bei 25 °C gegen Tris/HCl-Puffer pH 7,5, enthaltend 1 mM Mg^{++} , dialysiert. 37 S-, 16 S- und 6 S-Komponenten liegen dann im Gemisch vor und werden nach Chromatographie über Biogel A 5m rein erhalten (Abb. 44). Entsprechend wurde 5 S-Hämocyanin aus Cupiennius,

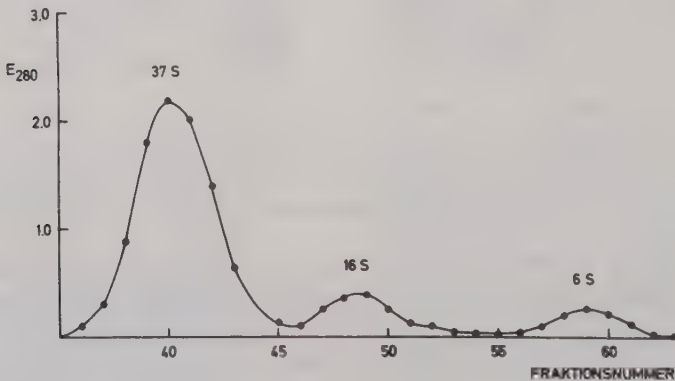


Abb. 44: Extinktionsverlauf in den Fraktionen nach Chromatographie der Reassoziante aus 6 S-Hcy über Biogel A 5m; Proteinkonzentration 2 mg/ml, 10 Tage bei 25 °C in Tris/HCl-Puffer pH 7,5, 1 mM Mg^{++} .

welches durch quantitative Dissoziation aus 24 S- bzw. 16 S-Einheiten gewonnen worden war, 6 Tage bei 25 °C gegen Tris/HCl-Puffer pH 7,5, enthaltend 40 mM Ca^{++} , dialysiert. Bei der Reassoziaton von 5 S-Hämocyanin, das aus 24 S-Material gewonnen worden war, wurde eine Konzentration von 4 mg/ml eingehalten. Es traten neben 16 S-Partikeln auch

24 S-Partikel auf. In der Versuchsserie mit 16 S-Hämocyanin als Ausgangsmaterial wurde nur eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt, wobei nach 6 Tagen 6 S- und 16 S-Komponenten erhalten wurden (Abb. 45).

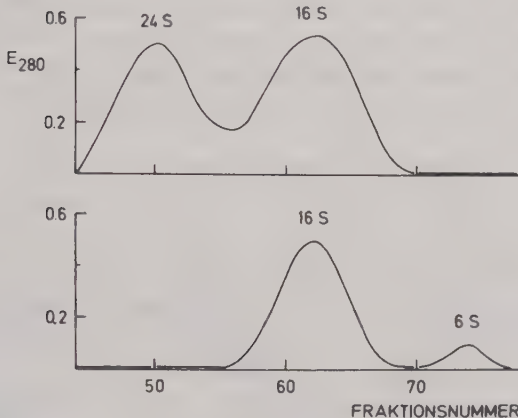


Abb. 45: Extinktionsverlauf in den Fraktionen nach Chromatographie der Reassoziante aus 5 S-HCy über Biogel A 5m; Reassoziationsdauer 6 Tage bei 25 °C, Tris/HCl-Puffer pH 7,5, 40 mM Ca^{++} ; oben: 5 S-Hämocyanin aus 24 S-HCy, Prot.-konz. 4mg/ml unten: 5 S-HCy aus 16 S-HCy, Prot. konz.-1 mg/ml

Die Messung der Sauerstoffbindungskurven führte zu folgenden Ergebnissen: Reassozierte Komponenten zeigen im Vergleich zu den entsprechenden nativen Einheiten durchwegs geringere P_{50} -Werte, haben damit eine höhere Sauerstoffaffinität, aber eine niedrigere Kooperativität (Tabelle 7). Interessant ist, daß ein Pufferwechsel von pH 9,6 (Bicarbonatpuffer) auf pH 7,9 (Phosphatpuffer), ohne eine Assoziation, eine Erhöhung des P_{50} -Wertes zur Folge hatte (Tabelle 7). Reassoziertes 16 S-Hämocyanin aus Dugesia zeigt die gleiche, hohe Sauerstoffaffinität wie das 6 S-Hämocyanin.

Reassozierte und native 16 S-Partikel aus *Cupiennius salei* zeigen in Gegenwart von 40 mM Ca^{++} eine wesentlich geringere O_2 -Affinität und sehr viel höhere Kooperativität als reassozierte 16 S-Partikel des *Dugesia*-Hämocyanins. Die aus 5 S-Molekülen (*Cupiennius*) reassozierten 16 S-Partikel verhalten sich unter den entsprechenden Bedingungen ziemlich gleichartig (mit nur unwesentlich geringeren P_{50} und n_{50}) wie native 16 S-Partikel, wobei es gleichgültig ist, ob das 5 S-Dissoziat aus der 24 S-Komponente oder aus der 16 S-Einheit gewonnen worden war (Tabelle 7).

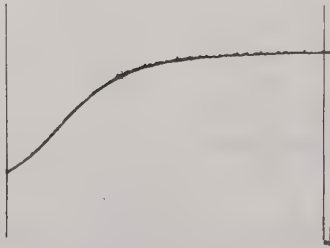


Abb. 46: Sauerstoffbindungs-kurve von 37 S nat., pH 7,3, 1 mM Mg^{++} , 25°C; Abszisse: $p\text{O}_2$, Ordinate: $E_{340 \text{ nm}}$, entspricht der Beladung.
Senkrechte Striche bedeuten 0 und 21 % Sauerstoff in der Atmosphäre.

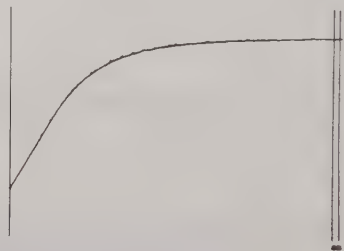


Abb. 47: Sauerstoffbindungs-kurve von 37 S reass., pH 7,2, 1 mM Mg^{++} , 25°C; Abszisse: $p\text{O}_2$, Ordinate: $E_{340 \text{ nm}}$, entspricht der Beladung.
Senkrechte Striche bedeuten 0 und 21 % Sauerstoff in der Atmosphäre.

Tabelle 7: Vergleich der O₂-Affinitäten und Hillkoeffizienten n₅₀ von nativen und reassozierten Einheiten, bei 25°C in Tris/HCl-Puffer (pH 7,3 ± 0,2), Phosphatpuffer (pH 7,9, I 0,1) und Bicarbonatpuffer (pH 9,6, I 0,1).

Hämocyanin-komponente	pH	Kat ⁺⁺	P ₅₀	n ₅₀	N
<u>Dugesiella</u>					
37 S nat.	7,3	1 mM Mg ⁺⁺	28,1 ± 0,6	2,4 ± 0,2	3
37 S reass.	7,2	1 mM Mg ⁺⁺	21,4 ± 0,7	1,6 ± 0,1	3
16 S reass.	7,2	1 mM Mg ⁺⁺	6,1	1,4	1
6 S "reass." ¹	7,2	1 mM Mg ⁺⁺	6,2	1	1
6 S nat.	7,9	- - - -	14,6 ± 0,7	1	2
6 S nat.	9,6 → 7,9	- - - -	9,4	1	1
6 S nat.	9,6	- - - -	5,0 ± 1	1	3
<u>Cupiennius</u>					
24 S nat.	ca. 7,5	40 mM Ca ⁺⁺	59,0 ± 2	4,6 ± 0,1	3
24 S reass.	7,2	40 mM Ca ⁺⁺	48,2	3,7	1
16 S nat.	ca. 7,5	40 mM Ca ⁺⁺	40,0 ± 4	3,3 ± 0,1	3
16 S reass. ²	7,2	40 mM Ca ⁺⁺	35,6	3,1	1
16 S reass. ³	7,1	40 mM Ca ⁺⁺	38,0	3,0	1

¹: Der nach Reassoziaton verbliebene Rest an 6 S-Material;

²: 5 S aus 24 S; ³: 5 S aus 16 S; ca. pH: Der pH-Wert wurde in diesen Fällen nicht nach Desoxygenierung gemessen. Ursprünglich wurden alle Puffer auf pH 7,5 eingestellt; mit zunehmender Versuchsdauer kommt es (CO₂) zu einer Senkung des pH-Wertes.

Analytische Ultrazentrifugation der Proben nach Desoxygenierung zeigte, daß im Falle von reassozierten 37 S-, 24 S- und 16 S-Einheiten keine Dissoziationserscheinungen aufgetreten waren. In den Beispielen der Abb. 46 mit 51 sind die unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften der Hämocyane aus *Dugesiella* und *Cupiennius* gut zu erkennen.

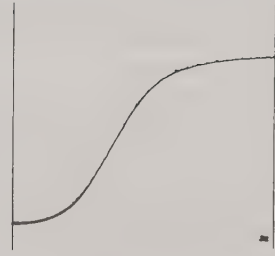


Abb. 48: Sauerstoffbindungs-
kurve von 24 S. nat. , pH ca.
7,5, 40 mM Ca^{++} , 25 °C;
Abszisse: pO_2 , Ordinate: E_{340}
nm, entspricht der Beladung.
Senkrechte Striche bedeuten 0
und 21 % Sauerstoff in der
Atmosphäre.

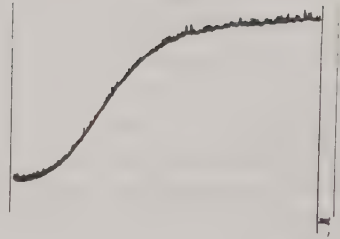


Abb. 49: Sauerstoffbindungs-
kurve von 16 S nat. (Cupiengius)
pH ca. 7,5, 40 mM Ca^{++} , 25 °C;
Abszisse: pO_2 , Ordinate: E_{340}
nm, entspricht der Beladung.
Senkrechte Striche bedeuten 0
und 21 % Sauerstoff in der
Atmosphäre.



Abb. 50: Sauerstoffbindungs-
kurve von 6 S-HCy, pH 9,6,
25 °C; Abszisse: pO_2 ,
Ordinate: E_{340} , entspricht
der Beladung.
Senkrechte Striche bedeuten
0 und 21 % Sauerstoff in der
Atmosphäre.

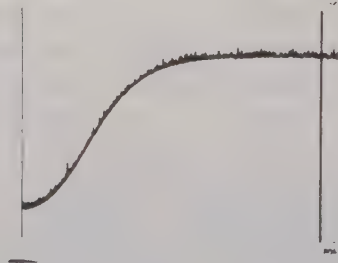


Abb. 51: Sauerstoffbindungs-
kurve von 16 S reass. (Cupieng-
nius) pH 7,2, 40 mM Ca^{++} , 25 °C,
Abszisse: pO_2 , Ordinate: E_{340}
nm, entspricht der Beladung.
Senkrechte Striche bedeuten 0
21 % Sauerstoff in der Atmos-
phäre.

D. DISKUSSION

1. Physikalische und chemische Charakterisierung von reinen Hämocyaninen

Hämocyanin aus *Cupiennius* besteht im neutralen pH-Bereich aus zwei Komponenten mit Sedimentationskonstanten von 16 S- und 24 S. Die 16 S- und 24 S-Einheiten sind ebenfalls die Hauptkomponenten der Crustaceen-Hämocyanine (Übersicht: Feytmans et al., 1966). Vogelspinnen-Hämocyanin liegt ausschließlich in Form von 37 S-Partikeln vor. 37 S-Hämocyanin findet sich ebenfalls bei der Vogelspinne *Avicularia metallica* (Van Bruggen in Ghiretti, 1968), bei mehreren Skorpionen und dem Xiphosuren *Limulus polyphemus* (Feytmans et al., s.o.). Unter den Bedingungen der Isoelektrofokussierung bildet 37 S-Hämocyanin aus Vogelspinnen noch höhermolekulare Aggregate (vgl. 2.3). Für das Dimer der 37 S-Einheit ergab sich eine Sedimentationskonstante von 54 S. Interessanterweise stellt 56 S-Hämocyanin die Hauptkomponente bei *Limulus polyphemus* dar (Van Bruggen in Ghiretti, 1968). Hämocyanin aus *Cupiennius* trat nie in Aggregaten auf, welche mit Sedimentationskonstanten über 24 S sedimentierten.

Im alkalischen pH-Bereich dissoziieren die Hämocyanine aus Vogel- und Kammspinnen über hochmolekulare Zwischenstufen in die kleinste, funktionelle Einheit. Die Bestimmung der Sedimentationskonstanten dieser Zwischenstufen, welche auch bei Reassoziationsversuchen beobachtet wurden, gestaltete sich schwierig, da diese Komponenten meist nur in geringen Prozentsätzen auftraten. Die Werte, 33 S und 27 S bzw. 18-20 S ("Z"), müssen daher mit Vorsicht betrachtet werden. Loewe (1972) konnte bei Dissoziation der Proteine von Gesamthämolymphe aus *Dugesia* ebenfalls 33 S- und 27 S-Partikel nachweisen.

Für die kleinste, funktionelle Einheit ergaben sich Werte von 5 S (*Cupiennius*) und 6 S (*Dugesia*). 5-6 S-Hämocyanin

findet sich bei allen untersuchten Crustaceen und bei *Limulus polyphemus* (Erikson-Quensel und Svedberg, 1936; Ellerton et al. , 1970; Morimoto und Kegeles, 1971; Murray und Jeffrey, 1974; Miller und Van Holde, 1974). Die Bestimmung der Molgewichte der kleinsten, funktionellen Einheiten nach Yphantis (1960) ergab Molekulargewichtsmittel von 69 900 (Cupiennius) und 70 300 Dalton (Dugesia). Diese Werte zeigen sehr gute Übereinstimmung mit Ergebnissen von Markl (1976), welcher mittels SDS-Gelelektrophorese Molgewichte von 72 000 (Cupiennius) und 71 000 Dalton (Dugesia) ermittelte. Wegen des etwas höheren S-Wertes bei Dugesia-Hämocyanin müßte man wohl eine etwas kompaktere Form für die Untereinheiten annehmen (da das Molgewicht ja praktisch identisch ist). Das gibt sich aber in dem EM-erkennbaren Bild bisher nicht zu erkennen.

Die Werte für Arachniden-Hämocyanin liegen damit etwas unter den Molgewichten, welche für Crustaceen-Hämocyanine (74 000-84 000 Dalton) bestimmt wurden (Loehr und Mason, 1973; Carpenter und Van Holde, 1973; Stewart et al. , 1973; Murray und Jeffrey, 1974; Roxby et al. , 1974). Die aus der Protein/Kupfer-Relation ermittelten Molgewichte (um 80 000 Dalton) für Vogel- und Kammspinnen sind infolge präparationsbedingter Kupferverluste zu hoch. Sie unterscheiden sich aber signifikant von Molekulargewichten, welche in analoger Weise für die kleinste, funktionelle Einheit des Mollusken-Hämocyanins bestimmt wurden (ca. 50 000 Dalton).

In den Endgruppenbestimmungen nach Edman (1950) verhielten sich die Hämocyanine aus Vogel- und Kammspinnen gleich. Die Ergebnisse aus den Chromatographien der organischen und wässrigen Phase erlauben den Schluß, daß die N-terminalen Aminosäuren blockiert sind. Zum gleichen Ergebnis kam Markl (1976) bei der Umsetzung von Arachniden-Hämocyanin mit Dansylchlorid. Waxman (1974) kam bei der Untersuchung von Hämocyanin aus *Homarus americanus* zum Schluß, daß das endständige Dipeptid blockiert ist: X-Glu-Asp. Bei X handelt es sich wahrscheinlich um einen Acetylrest. Brouwer und

Kuiper (1973) fanden, daß die N-terminale Aminosäure des α -Hämocyanins aus *Helix pomatia* ebenfalls blockiert ist. Stewart et al. (1973) bestimmten für Hämocyanin des Flußkrebsses *Jasus lalandii* N-terminales Arginin. Die Blockierung der N-Terminus ist also ein bei Hämocyaninen weit verbreitetes Phänomen.

Die N-terminalen Aminosäuren der Begleitproteine aus *Dugesia* und *Cupiennius* sind ebenfalls blockiert. Dieses Ergebnis stellt neben der Sedimentationskonstante von 16 S die einzige Gemeinsamkeit zwischen Begleitprotein und Hämocyanin dar. Untersuchungen zum elektrophoretischen Verhalten, Sauerstoffbindungsmessungen, Versuche zum Dissoziations-Assoziationsverhalten und signifikante Unterschiede in der Quartärstruktur zeigen schließlich, daß es sich hierbei um ein Protein handelt, welches die für Hämocyanine typischen Eigenschaften nicht besitzt. Analytische Dissoziations-Assoziationsversuche von geronnener und zentrifugierter Hämolymphe zeigen keine Unterschiede (Markl, 1976); das Begleitprotein kann daher kein Fibrinogen sein. Die Bedeutung dieses Proteins müsste Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

2. Das Dissoziations-Assoziationsverhalten

2.1 Die pH-Abhängigkeit der Quartärstruktur

Die Proteinkomponenten der Arachnidenhämocyanine stehen in einem für Hämocyanine typischen Dissoziations-Assoziationsgleichgewicht. Untersuchungen von Loewe und Linzen (1973, 1975) an Gesamthämolymphe aus *Dugesia californica* und *Cupiennius salei* (Proteinkonzentration 4-8 mg/ml) zeigen eine pH-Abhängigkeit dieses Gleichgewichts. Ab pH 9,1 - in Abwesenheit von Mg^{++} - wird dieses sehr rasch zu Gunsten der kleinsten, funktionellen Einheiten verschoben. In Gegenwart von Mg^{++} (10 mM) kommt es bei beiden Spinnen zu einer Erweiterung des Stabilitätsbereichs; *Dugesia*-Hämocyanin liegt über den ganzen, untersuchten pH-Bereich (pH 5,8-10,3) vollständig in Form von 37 S-Partikeln vor.

Aufbauend auf diese Versuche wurden Experimente mit gereinigten Hämocyaninen (37 S- bzw. 24 S-HCy) bei verschiedenen Proteinkonzentrationen (0,5-6 mg/ml) und Temperaturen (5° und 25 °C) durchgeführt. Neben der Dissoziation im alkalischen wurde eine Zerlegung von 37 S- bzw. 24 S-Hämocyanin überraschenderweise im physiologischen pH-Bereich (pH 7,8- 7,95) beobachtet, wenn als Puffersalz Phosphat verwendet wurde. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Loewe (1972) zeigte 37 S-Hämocyanin bei pH 7,5 und einer Proteinkonzentration von 6 mg/ml keine Dissoziation; eine Erhöhung des pH-Wertes auf 7,85 hingegen führte auch bei gleich hoher Proteinkonzentration zu einer signifikanten Dissoziation: 58 % 37 S-, 26 % 16 S- und 16 % 6 S-Einheiten. Loewe (1972) untersuchte den pH-Bereich 7,7-8,3 nicht. Verwendet man an Stelle von Phosphat-Tris/HCl-Puffer, so liegen, ab einer Proteinkonzentration von 1,5 mg/ml, nur 37 S-Moleküle vor. Der stark stabilisierende Effekt von Tris/HCl-Puffer zeigte sich auch bei Untersuchungen im alkalischen Dissoziationsbereich (vgl. 7.1). Wird unverdünnte Hämolymphe (Vol. ca. 500 μ l) mit 0,1 N HCl (ca. 20-25 μ l) auf pH 7,8-7,9 eingestellt, so tritt über Nacht eine deutliche Dissoziation ein. Dieser Vorgang kann nur durch heterotrope Wechselwirkung von Protonen mit 37 S-Hämocyanin erklärt werden, da die geringfügige Erhöhung der Ionenstärke bzw. Chloridkonzentration nach den bisherigen Ergebnissen die Dissoziation nicht beeinflussen, oder höchstens hemmen würde.

Im stoffwechselaktiven Gewebe kommt es infolge der Abbauprozesse (CO_2 - und Milchsäurebildung) zu einer pH-Erniedrigung. Es wäre nun vorstellbar, daß dieser Vorgang zu einer Dissoziation von 37 S-Hämocyanin führt. Eine Dissoziation erschiene aber nur dann sinnvoll, wenn die O_2 -Affinität der kleinsten, funktionellen Einheit geringer wäre und damit die O_2 -Abgabe an die Gewebe erleichtert werden würde. Zwar zeigt 6 S-Hämocyanin bei pH 7,9 eine wesentlich geringere O_2 -Affinität als bei pH 9,6 ($p_{50} = 14,6$ gegenüber 5,0 mm Hg); Pufferwechsel (nach erfolgter Dissoziation)

von pH 9,6 auf 7,9 und anschließende, zweitägige Dialyse führt ebenfalls zu einer Erniedrigung der O_2 -Affinität ($p_{50} = 9,4$ mm Hg). Die O_2 -Affinität des 37 S-Hämocyanins ist jedoch in der Regel noch wesentlich geringer (vgl. Tabelle 7). Aus diesem Grund kann dieser Dissoziation im physiologischen pH-Bereich keine physiologische Bedeutung zukommen, da eine Entstehung von hochaffinen, kleinsten, funktionellen Einheiten den Bohreffekt kompensieren würde.

Bei der Untersuchung der Dissoziations- und Assoziationsvorgänge zeigte sich eine Abhängigkeit von der Temperatur und der Proteinkonzentration: Temperaturerhöhung führte im gesamten pH-Bereich zu einer Steigerung des Anteils niedermolekularer Einheiten, Erhöhung der Proteinkonzentration verschob die Gleichgewichte in Richtung der Assoziationsprodukte.

2.2 Der Einfluß der Ionenstärke

Die Dissoziation von Hämocyaninen wird von der Ionenstärke der Puffer sehr unterschiedlich beeinflusst. Wird 37 S-Hämocyanin zwei Tage gegen pH 5,4 (1 M NaCl) dialysiert, so erfolgt keine Dissoziation. In analoger Weise bewirkt eine Erhöhung der Ionenstärke bei pH 7,0 und 9,65 eine Stabilisierung der Quartärstruktur (vgl. 7.1). Da hydrophobe Gruppen bei diesem Vorgang "ausgesalzt" werden, läßt das Verhalten der Hämocyanine unter diesen Bedingungen eine Beteiligung von hydrophoben Bindungskräften zwischen den Untereinheiten als sehr wahrscheinlich erscheinen. Hämocyanin aus *Pila leopoldvillensis* verhält sich unter vergleichbaren Bedingungen analog, während α -Hämocyanin aus *Helix pomatia* dissoziiert (Elliott et al., 1971). Die Dissoziation des α -Hämocyanins aus *Helix pomatia* ist weniger eine Wirkung der Ionenstärke per se, als ein Effekt der Chloridanionen (Engelborghs und Lontie, 1973), welcher die Protein-Solvent-Interaktionen erhöht und zu einem energieärmeren, d. h. stabileren Zustand der Lösung führt.

2.3 Einfluß von Komplexbildnern und der Pufferspezies

Dialyse gegen Komplexbildner (Tris/HCl-Puffer pH 8,0, 30 mM EDTA) führte zu keiner Änderung des Aggregationszustandes von 37 S-Hämocyanin. α -Hämocyanin aus *Helix pomatia* dissoziiert unter vergleichbaren Bedingungen (Witters und Lontie, 1968). Hämocyanin aus *Limulus polyphemus* wird bei Dialyse gegen EDTA (pH 8,9, 10 mM EDTA) ebenfalls quantitativ in 5 S-Partikel zerlegt (Sullivan et al., 1974).

Eine quantitative Zerlegung von 37 S- bzw. 24 S-Hämocyanin, in 6 S- bzw. 5 S-Einheiten, gelingt erst bei alkalischen pH-Werten. Sie erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit Tris/Borat- (pH 9,7) oder Bicarbonatpuffer (pH 9,3). Die wesentlich stärker dissoziierende Wirkung von Bicarbonatpuffer muß bei physiologischen Betrachtungen und entsprechenden Experimenten berücksichtigt werden. Die oberhalb von pH 9 schlagartig (innerhalb ca. 0,3 pH-Einheiten) einsetzende Dissoziation ist nur mit einem kooperativen Prozeß zu erklären. Erhöhung der Temperatur wirkt beschleunigend. Erhöhung der Proteinkonzentration führt auch bei diesem pH-Wert zu einem höheren Anteil an 37 S-Einheiten (vgl. Abb. 28).

Wird 37 S-Hämocyanin mittels Tris/Borat bzw. Bicarbonatpuffer quantitativ dissoziiert, zeigen sich bei anschließend durchgeführten Reassoziationsversuchen unterschiedliche Ergebnisse. Nach Tris/Borat-Dissoziation ist 6 S-Hämocyanin (Proteinkonzentration 0,5 mg/ml), in Gegenwart von 1 mM Mg^{++} , im Verlauf einer Woche quantitativ in 37 S-Hämocyanin reassoziert, während nach Bicarbonatdissoziation, unter vergleichbaren Bedingungen, nach 11 Tagen nur 72 % 37 S-Partikel vorliegen. Unterschiedliches Reassoziationsverhalten nach unterschiedlicher Dissoziation wurde auch bei Mollusken-Hämocyaninen beobachtet (Eriksson-Quensel und Svedberg, 1936; Brohult und Borgmann, 1944; Konings et al., 1969 b). Eine Rekonstitution von 37 S aus 6 S-Einheiten ist in Tris/HCl-

Puffer auch ohne Zusatz zweiwertiger Kationen möglich; in Veronalpuffer hingegen liegen, bei gleichem pH-Wert, nach 11 Tagen 100 % 6 S-Komponenten vor. Dies zeigt, daß neben dem pH-Wert die Pufferspezies entscheidend ist. Die stabilisierende Wirkung des Tris/HCl-Puffers wurde schon früher erwähnt (vgl. 7.1).

2.4 Der Einfluß von Ca^{++} und Mg^{++} und der Proteinkonzentration

Auch in Abwesenheit zweiwertiger Kationen ist eine Reassozi-
ziation von 37 S- aus 6 S-Hämocyanin möglich. Durch Zugabe
von bereits 1 mM Mg^{++} kommt es zu einer signifikanten Er-
höhung der Reassoziationsrate von 37 S-Hämocyanin. Eine
weitere Erhöhung der Mg^{++} - Konzentration auf 10 bzw. 100 mM
führt zu einer mit steigender Mg^{++} -Konzentration abnehmenden
Rate an 37 S-Partikeln; bei 100 mM Mg^{++} kommt es außerdem zur
Bildung von nicht definierten, hochmolekularen Aggregaten.
In Gegenwart von 4 mM Ca^{++} ist der Anteil an reassozierten
37 S-Partikeln geringer wie in Anwesenheit von 1 mM Mg^{++} ;
eine Erhöhung der Ca^{++} -Konzentration auf 40 mM bewirkt einen
hohen Anteil an reassozierten 16 S-Einheiten, welche in vivo
nicht vorliegen. Damit ist ein Vergleich der funktionellen
Eigenschaften von Monomer (16 S) und Tetramer (37 S) möglich.
1 mM Mg^{++} - die Konzentration in vivo - ist damit die zur
Reassozi-ation optimale Konzentration.

Bei Parallelversuchen mit 5 S-Hämocyanin aus *Cupiennius salei*
zeigte sich bei Verwendung von 40 mM Ca^{++} (zehnfache Häm-
olymphekonzentration) die höchste Reassoziationsrate an 16 S-
bzw. 24 S-Partikeln. Die Anwesenheit von 100 mM Mg^{++} führte
gleichfalls zur Bildung von undefinierten Aggregaten.

Reassozi-ation von 5 S-Hämocyanin aus *Cupiennius salei* führte
bei einer Proteinkonzentration von 0,25, bzw. 1 mg/ml nur
bis zur 16 S-Komponente (vgl. Abb. 31). Wurde die Konzen-
tration auf ca. 4 mg/ml erhöht, so konnte auch 24 S-Hämocyanin
reassozi-iert werden (vgl. 8.4). Die Abhängigkeit der Reasso-
ziation von der Proteinkonzentration ist auch bei *Dugesia*
signifikant (vgl. Abb. 32, Tabelle 5). Bei Reassoziations-

versuchen mit Molluskenhämocyanin zeigte sich eine analoge, aber wesentlich schwächer ausgeprägte Abhängigkeit der Rekonstitution der hochmolekularen Komponenten (Konings et al. , 1969). Zusätze zweiwertiger Kationen und Erhöhung der Proteinkonzentration beschleunigen die Assoziation; trotzdem verläuft dieser Vorgang sehr viel langsamer wie seine Umkehrung, die Dissoziation. Die unterschiedliche Geschwindigkeit dieser beiden Vorgänge ist nicht nur für Arachnidenhämocyanin charakteristisch; Analoges findet man bei Mollusken (Siezen, 1974; Konings et al. , 1969b).

3. Vergleich zwischen nativen und reassozierten Hämocyaninen

Die Sedimentationskoeffizienten von nativen und reassozierten 37 S-, 24 S- und 16 S-Partikel zeigen völlige Übereinstimmung (vgl. 8.1). Analoges ist aus Untersuchungen an Mollusken- (Konings et al. , 1969b) und Crustaceen-hämocyaninen (Carpenter und Van Holde, 1973) bekannt. Native und reassozierte 37 S-Hämocyanine besitzen daneben eine identische, elektrophoretische Beweglichkeit. Reassozierte 16 S- und 25 S-Hämocyanine aus *Cancer magister* zeigen ebenfalls keine Unterschiede im elektrophoretischen Verhalten (Carpenter und Van Holde, 1973). 25 S-Partikel des *Cancer magister* - Hämocyanins konnten aber nur in sehr geringen Mengen erhalten werden. Dies wurde als Konsequenz unterschiedlicher Untereinheiten gedeutet: Infolge der Mikroheterogenität der kleinsten, funktionellen Einheiten wurde nur ein geringer Anteil an jenem 16 S-Hämocyanin gebildet, welches die Fähigkeit zur Dimerisierung besitzt und damit eine physiologische, molekulare Organisation aufweist. Die Bildung von Dimeren bzw. Tetrameren war beim Spinnenhämocyanin bis zu einer Ausbeute von 100 % möglich. Diese Befunde sprechen für eine homogene molekulare Organisation des Arachnidenhämocyanins. Elektronenmikroskopische Aufnahmen (vgl. 8.3) zeigen auch die strukturelle Übereinstimmung von nativen und reassozierten Arachnidenhämocyaninen. Busselen (1970) fand andererseits zwischen

nativen und reassozierten Hämocyaminen aus *Carcinus maenas* Unterschiede in der elektrophoretischen Beweglichkeit.

Ein Vergleich der funktionellen Eigenschaften zeigt, daß reassozierte Komponenten im Vergleich zu den entsprechenden nativen Einheiten geringere p_{50} -Werte, damit eine höhere Sauerstoffaffinität, aber eine niedrigere Kooperativität besitzen (vgl. Tabelle 7).

Reassozierte 16 S- und der nach Reassoziation verbliebene Rest an 6 S-Hämocyanin aus *Dugesia* zeigen eine identische, sehr hohe Sauerstoffaffinität ($p_{50} = 6,1$ bzw. $6,2$ mm Hg); 16 S-Einheiten sind im Gegensatz zur 6 S-Komponente durch das Auftreten von positiven Interaktionen zwischen den sauerstoffbindenden Zentren gekennzeichnet ($n_{50} = 1,4$). Die weiterführende Assoziation der Monomeren führt zu einer Wechselwirkung, die durch Herabsetzung der Affinität und Erhöhung der Kooperativität gekennzeichnet ist: Für das tetramere 37 S-Partikel wurden für p_{50} und n_{50} Werte von $21,4 \pm 0,7$ mm Hg bzw. $1,6 \pm 0,1$ ermittelt.

Bei Hämocyanin aus *Cupiennius* sind die Werte für p_{50} und n_{50} bei nativen 24 S-Einheiten höher, als bei nativen 16 S-Partikeln ($p_{50} = 59,0 \pm 2$, $n_{50} = 4,6 \pm 0,1$ gegenüber $p_{50} = 40,0 \pm 4$, $n_{50} = 3,7$). Das in 40 mM Ca^{++} rekonstituierte 16 S-Hämocyanin unterscheidet sich vom nativen 16 S-Hämocyanin fast gar nicht (vgl. Tabelle 7). Es ist dabei gleichgültig, ob die Rekonstitution aus 5 S-Hämocyanin erfolgt, das aus 24 S-Hämocyanin gewonnen wurde, oder aus solchem, das aus 16 S-Hämocyanin entstanden ist (vgl. Tabelle 7). Dies zeigt, daß 24 S- und 16 S-Hämocyanine homolog sind, d.h. aus den gleichen Untereinheiten bestehen und vermutlich in einem echten, wenn auch sehr langsam sich einstellendem Gleichgewicht stehen.

Die Sauerstoffaffinitäten und Hillkoeffizienten der verschiedenen Einheiten sind gut vergleichbar, da in jedem Fall einheitliches (5 S- bzw. 6 S) Ausgangsmaterial ein-

gesetzt wurde und die Proben zudem gleich alt und identischen Umweltfaktoren ausgesetzt waren. Ob die Unterschiede bezüglich p_{50} und n_{50} , zwischen nativen und reassozierten Hämocyaninen, auf einer unvollständigen Ausbildung der Quartärstruktur beruhen oder nicht, könnte eventuell ein Vergleich der Dissoziationskinetiken von nativen und reassozierten Hämocyaninen zeigen. Auch ein partieller Kupferverlust nach Reassoziaton könnte die Ursache für diesen Sachverhalt sein; diesbezügliche Untersuchungen wurden noch nicht durchgeführt. Johnston et al. (1967) fanden keine Unterschiede beim Vergleich der O_2 -Dissoziationskurven von nativen und reassozierten Hämocyaninen aus *Panulirus interruptus*, jedoch eine reassoziationsbedingte Abnahme der Sauerstoffkapazität. Dies würde für Kupferverlust sprechen. Bezüglich der Sauerstoffkapazität wurden bei Arachnidenhämocyaninen bisher keine Untersuchungen durchgeführt; reassozierte Hämocyanine zeigten aber keine signifikante Abweichungen im Verhältnis der Extinktionen bei 280 und 340 nm (Verhältnis ca. 4 : 1).

Jedenfalls läßt sich als Fazit dieser Versuche feststellen, daß die Dimerisierung von 16 S- zu 24 S-Hämocyanin (*Cupiennius*), bzw. die Tetramerisierung von 16 S- zu 37 S-Partikeln (*Dugesia*) eine weitergehende funktionelle Wechselwirkung zwischen den Untereinheiten beinhaltet, als sie in der 16 S-Einheit allein gegeben ist.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Proteine im Blut der Kammspinne *Cupiennius salei* und der Vogelspinne *Dugesiella californica* wurden analytisch getrennt und charakterisiert. Discelektrophoretische Auftrennung kombiniert mit Sedimentationsanalysen, ermöglichte eine Korrelation zwischen Bandenmuster und Sedimentationskoeffizienten. Bei den Vogelspinnen wurde neben einer langsam wandernden (37 S-Einheit) eine wesentlich schnellere Bande (16 S-Einheit) beobachtet. Bei *Cupiennius salei* traten eine mittelschnelle sowie zwei schnellere Banden auf, welche in der analytischen Ultrazentrifuge mit 24 S bzw. 16 S sedimentierten.

Mittels mehrerer präparativer Methoden (Dichtegradientenzentrifugation, Molekularsiebchromatographie, Isoelektrofokussierung) gelang die Isolierung aller vorliegenden Komponenten.

2. Als Sedimentationskonstanten wurden ermittelt: $S_{20w}^0 = 36,7$ S, 5,8 S (Vogelspinnen) und 23,4 S, 15,9 S, 4,7 S (*Cupiennius salei*); für die Begleitproteine ergaben sich Werte von 16,1 S (*Dugesiella*) und 15,9 S (*Cupiennius*). Als spezifisches Partialvolumen wurden 0,723 ml/g (aus der Aminosäureanalyse) zugrunde gelegt.

3. Versuche zur Charakterisierung dieser Komponenten (elektrophoretisches Verhalten, I.E.P. -Werte, UV-Spektren, O_2 -Bindung, Cu-Gehalt, Dissoziations-Assoziationsverhalten, Elektronenmikroskopie) zeigen, daß in der Hämolymphe der Vogelspinnen neben 37 S-Hämocyanin (82 %) ein mit 16 S sedimentierendes Begleitprotein (18 %) unbekannter Funktion vorliegt. Die Hämolymphe von *Cupiennius* enthält neben 24 S-Hämocyanin (50 %) eine Proteinfraction (50 %) welche mit 16 S sedimentiert. Sie setzt sich zu gleichen Teilen aus 16 S-Hämocyanin (25 %) und 16 S-Begleitprotein (25 %) zusammen. Die N-terminalen Aminosäuren der Hämocyanine und Begleitproteine sind blockiert.

4. Die Bestimmung der Molgewichte der kleinsten, funktionellen Einheiten mittels Sedimentations-Diffusionsgleichgewicht ergab Werte von 69 900 (Cupiennius) und 70 300 Dalton (Dugesiella). Aus der Cu/Protein-Relation errechneten sich Molgewichte um 80 000 Dalton. Die unterschiedlichen Sedimentationskonstanten von 5 S (Cupiennius) und 6 S (Dugesiella) müssen daher in einer unterschiedlichen Tertiärstruktur begründet sein.

5. 37 S- und 24 S-Hämocyanine zeigen ein charakteristisches Dissoziations-Assoziationsverhalten, das von pH-Wert, Temperatur, Pufferspezies, Ionenstärke, Proteinkonzentration und der Konzentration von Ca^{++} und Mg^{++} abhängig ist. Neben der Zerlegung im alkalischen Bereich wurde eine Dissoziation von 37 S- (Dugesiella) bzw. 24 S-Hämocyanin (Cupiennius) im physiologischen pH-Bereich beobachtet. Temperaturerhöhung führte im gesamten pH-Bereich zu einem erhöhten Anteil an niedermolekularen Einheiten, Erhöhung der Proteinkonzentration verschiebt die Gleichgewichte in Richtung der Assoziationsprodukte.

6. Die Reassoziatio n zeigt eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Proteinkonzentration und der Anwesenheit zweiwertiger Kationen (Ca^{++} , Mg^{++}). Hohe Proteinkonzentration (5 mg/ml) und Zusätze von 1 mM Mg^{++} (physiologische Konzentration) führen zu einer quantitativen Reassoziatio n von 37 S-Hämocyanin (Dugesiella). Bei einer Proteinkonzentration von 4 mg/ml ist in Anwesenheit von 40 mM Ca^{++} (zehnfache Hämolymphekonzentration) eine Rekonstitutio n von 24 S-Partikeln (Cupiennius) möglich. Unter diesen Bedingungen können 37 S-Einheiten aus Dugesiella nur in einer Ausbeute von 85 % reassoziert werden; es verbleibt ein Rest an 16 S-Partikeln (15 %). Mit der Isolierung von reassozierten 16 S-Hämocyaninen aus Dugesiella und Cupiennius war ein struktureller und funktioneller Vergleich zwischen nativen und reassozierten Hämocyaninen möglich.

7. Ein Vergleich der Sedimentationskoeffizienten, der

elektrophoretischen Beweglichkeiten und der Quartärstrukturen im elektronenmikroskopischen Bild zeigen eine völlige strukturelle Übereinstimmung zwischen nativen und reassozierten Hämocyaninen.

8. Reassozierte Hämocyanine sind in der Lage, Sauerstoff reversibel zu binden. Im Unterschied zu den nativen Hämocyaninen sind sie durch eine höhere Sauerstoffaffinität bei verringerter Kooperativität gekennzeichnet.

Die Assoziation der Monomeren führt zu einer Wechselwirkung, die durch Herabsetzung der Affinität und Auftreten von Kooperativität gekennzeichnet ist.

Bei Hämocyanin aus *Cupiennius* sind die Werte für p_{50} und n_{50} bei nativen 24 S-Einheiten höher, als bei nativen 16 S-Partikeln. Das in 40 mM Ca^{++} rekonstituierte 16 S-Hämocyanin unterscheidet sich vom nativen 16 S-Hämocyanin fast gar nicht.

Es ist für die Werte von p_{50} und n_{50} gleichgültig, ob die Rekonstitution aus 5 S-Hämocyanin erfolgt, das aus 24 S-Hämocyanin gewonnen wurde, oder aus solchem, das aus 16 S-Hämocyanin entstanden ist.

F. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Acher, R., Crocker, C.: Biochim. Biophys. Acta 9, 704 (1952).
- Bramhall, S., Noack, M. WU u. Loewenberg, J.R.: A simple colorimetric method for determination of protein. Anal. Biochem. 31, 146-148 (1969).
- Brenner, S., Horne, R.W.: A negative staining method for for high resolution electron microscopy of viruses. Biochim. Biophys. Acta 34, 103-110 (1959).
- Brohult, S., Borgmann, K.: L'hemocyanine de Helix pomatia, est-elle composée de deux espèces de molécules? "The Svedberg 1884-1944", Almqvist und Wiksell, Uppsala und Stockholm, 429-437 (1944).
- Brouwer, M., Kuiper, H.A.: Molecular-weight analysis of Helix pomatia α -haemocyanin in guanidine hydrochloride, urea and sodium dodecylsulfate. Eur. J. Biochem. 35, 428-435 (1973).
- Busselen, P.: The electrophoretic heterogeneity of Carcinus maenas haemocyanin. Arch. of Biochem. Biophys. 137, 415-420 (1970).
- Carpenter, D.E., Van Holde, K.E.: Amino acid composition, amino-terminal analysis and subunit structure of Cancer magister haemocyanin. Biochemistry 12, 2231-2238 (1973).
- Chervenka, C.H.: A manual of methods for the analytical ultracentrifuge. Spinco Division of Beckman Instruments, Palo Alto, California 94304 (1973).
- Czichos-Tiedt, S.: Versuche zur Reinigung und Charakterisierung des Hämocyanins aus der Spinne Cupiennius salei Keyserling. Dissertation, München 1975.
- Edman, P.: Method for determination of the amino acid sequence in peptides. Acta Chem. Scand. 4, 283-293 (1950).
- Elias, H.G.: Ultrazentrifugen-Methoden. München: Beckman Instruments GmbH 1969.
- Ellerton, H.D., Carpenter, D.E., Van Holde, K.E.: Physical studies of haemocyanins. V. Characterization and subunit structure of the hemocyanin of Cancer magister. Biochemistry 9, 2225-2232 (1970).
- Elliott, F.G., Witters, R., Borginon, H., Lontie, R.: The hemocyanin of Pila Leopoldvillensis-III. The Dissociation studied by Ultracentrifugation. Comparison with the α -haemocyanin of Helix pomatia. Comp. Biochem. Physiol. Vol 42B, 649-657 (1971).

- Engelbourghs, Y., Lontie, R.: Dissoziation of *Helix pomatia* hemocyanin under the influence of alkali salts. *J. Mol. Biol.* 77, 577-587 (1973).
- Erikson-Quensel, I.B., Svedberg, T.: The molecular weights and pH-stability regions of the hemocyanins. *Biol. Bull.* 71, 498-547 (1936).
- Feytmans, E., Wibo, M., Berthet, J.V.: Sedimentation constants of arthropod haemocyanins. *Arch. Internat. Physiol. Biochim.* 74, 917-918 (1966).
- Gindler, E.M., Heth, D.A.: *Clinical Chemistry* 17, 662 (1971).
- Haschenmeyer, R.H., Haschenmeyer, A.E.: Proteins, 160-166, Wiley-Verlag, New-York (1973).
- Itano, H.A., Gottlieb, A.J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 12, 405 (1963).
- Johnston, W., James, T.W., Barber, A.: Oxygen Binding Characteristics of Lobster haemocyanin and its subunits. *Comp. Biochem. Physiol.* 22, 261-271 (1967).
- Kaltschmidt, E., Wittmann, H.G.: *Analyt. Biochem.* 43, 25-34 (1971).
- Konings, W.N., Van Driel, R., Van Bruggen, E.F.J., Gruber, M.: Structure and properties of hemocyanins V. Binding of oxygen and copper in *Helix pomatia* hemocyanin. *Biochem. Biophys. Acta* 194, 55-66 (1969).
- Konings, W.N., Siezen, R.J., Gruber, M.: Structure and properties of hemocyanins VI. Assoziation-dissoziation behavior of *Helix pomatia* hemocyanin. *Biochim. et Biophys. Acta* 194, 376-385 (1969 b).
- Loehr, J.S., Mason, H.S.: Dimorphism of Cancer magister hemocyanin subunits. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 51, 741-745 (1973).
- Loewe, R., Linzen, B., v. Stackelberg, W.: Die gelösten Stoffe in der Hämolymphe einer Spinne, *Cupiennius salei* Keyserling. *Z. vergl. Physiol.* 66, 27-34 (1970).
- Loewe, R.: Hämocyanin in der Hämolymphe zweier Spinnen, *Dugesia californica* und *Cupiennius salei* Keyserling. Dissertation, München 1972.
- Loewe, R., Linzen, B.: Haemocyanins in Spiders. II. Automatic Recording of Oxygen Binding Curves, and the Effect of Mg^{++} on Oxygen Affinity, Cooperativity, and Subunit Association of *Cupiennius salei* Haemocyanin. *J. comp. Physiol.* 98, 147-156 (1975).

- Loewe, R., Linzen, B.: Subunits and Stability Region of *Dugesia californica* Haemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 354, 182-188 (1973).
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Tarr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).
- Long, C.: Biochemists' handbook. London: E. & F. Spon Ltd. 1961.
- Macko, V., Stegemann, H.: Free electrofocusing in a coil of polyethylene tubing. Anal. Biochem. 37, 186-190 (1970).
- Markl, J.: Das Hämocyanin dreier Spinnenarten: Isolierung und chemische Charakterisierung. Dissertation, München 1976.
- Martinek, R.G., Berry, R.E.: Clin. Chem. Acta 10, 365-374 (1964).
- Mattenheimer, H.: Mikromethoden für das klinisch-chemische und biochemische Laboratorium. Walter de Gruyter & Co 1966.
- Maurer, H.R.: Disk-Elektrophorese. Berlin: Walter de Gruyter & Co 1968.
- Melchers, M.: Zur Biologie und zum Verhalten von *Cupiennius salei* Keyserling, einer amerikanischen Ctenide. Zool. Jb., Abt. System., Ökol. und Geogr. 91, 1-90 (1963).
- Melchers, M.: Zur Biologie der Vogelspinnen. Z. Morph. Ökol. Tiere 53, 517-536 (1964).
- Miller, K., Van Holde, K.E.: Oxygen Binding by *Callinassa californiensis* Hemocyanin. Biochemistry Vol. 13, No. 8 (1974).
- Morimoto, K., Kegeles, G.: Subunit interactions of Lobster hemocyanin. I. Ultracentrifuge studies. Arch. Biochem. and Biophys. 142, 247-257 (1971).
- Murray, A.C., Jeffrey, P.D.: Hemocyanin from the Australian Freshwater Crayfish *Cherax destructor*. Subunit Heterogeneity. Biochemistry Vol. 13, No. 18, 3667-3671 (1974).
- Needleman, S.B.: Protein Sequence Determination. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New-York (1970).
- Roxby, R., Miller, K., Blair, D.P., Van Holde, K.E.: Subunits and association equilibria of *Callinassa californiensis* hemocyanin. Biochemistry 13, 1662-1668 (1974).
- Siezen, R.J., Van Driel, R.: Structure and properties of hemocyanins VIII. Microheterogeneity of α -hemocyanin of *Helix pomatia*. Biochim. et Biophys. Acta 295, 131-139 (1973).

- Siezen, R.J.: Structure and Properties of Hemocyanins.
XIV. Reassociation of *Helix pomatia*-Hemocyanin.
J. Mol. Biol. 90, 103-113 (1974).
- Stewart, L.B., Fleming, J.S., Ellerton, H.D.: Physical studies on the hemocyanin from *Jasus lalandii*.
Proc. Aust. Biochem. Soc. 6, 23 (1973).
- Sullivan, B., Bonaventura, J., Bonaventura, C.: Functional differences in the multiple hemocyanins of the Horseshoe-crab, *Limulus polyphemus*. *Proc. Nat. Academic Sci. USA*, Vol. 71, No. 6, 2558-2562 (1974).
- Van Bruggen, E.F. J.: Electron microscopy of hemocyanins (F. Ghiretti ed.), p. 37-48. London and New York: Academic Press 1968.
- Vinograd, J., Bruner, R., Kent, R., Weigle, J.: Bandcentrifugation of macromolecules and viruses in self generating density gradients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 49, 902 (1963).
- Waxman, L.: The Structure of Arthropod and Mollusc Hemocyanin. *J. Biol. Chem.* Vol. 250, No. 10, 3796-3806 (1975).
- Weber, K., Osborn, M.: The reliability of molecular weight determination by dodecyl-sulfat-polyacrylamid gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412 (1969).
- Witters, R., Lontie, R.: Stability regions and amino acid composition of gastropod haemocyanins. In: Physiology and biochemistry of haemocyanins (F. Ghiretti ed.), 61-73. London and New York: Academic Press 1968.
- Yphantis, D.A.: Rapid determination of molecular weights of peptides and proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 88, 586 (1960).

L E B E N S L A U F

Ich wurde am 15. 5. 1948 in Fürstenfeldbruck als Sohn des Oberverwalters Franz Schmid und seiner Ehefrau Veronika geboren. Von 1954 bis 1959 besuchte ich die Volksschule in Fürstenfeldbruck, daran anschließend die Oberrealschule im gleichen Ort. Dort legte ich im Juli 1968 das Abitur ab. Im November des gleichen Jahres begann ich mit dem Studium der Chemie und Biologie an der Universität München. Im Herbst 1973 legte ich das Staatsexamen im Fachbereich Chemie/Biologie ab. Im Februar 1974 begann ich die vorliegende Promotionsarbeit. Ich bin seit 1974 verheiratet.

